



# Función de los poliprenoles en la síntesis de polisacáridos

Romero Martinez, Pedro Antonio  
1977

Tesis Doctoral

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Universidad de Buenos Aires

[www.digital.bl.fcen.uba.ar](http://www.digital.bl.fcen.uba.ar)

Contacto: [digital@bl.fcen.uba.ar](mailto:digital@bl.fcen.uba.ar)

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Fuente / source:

Biblioteca Digital de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

FUNCION DE LOS POLIPRENOLES EN LA  
SINTESIS DE POLISACARIDOS

Autor: Pedro Antonio Romero Martinez

Director: Dr. Marcelo A. Dankert

Lugar de Trabajo: Instituto de Investigaciones Bioquímicas  
"Fundación Campomar"

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS  
ORIENTACION QUIMICA BIOLOGICA

1977

1545  
ej. 2

1545 -

A mis padres

A Luisa Inelia

INDICE

INDICE	I
AGRADECIMIENTOS	III
ABREVIATURAS	V
RESUMEN	VII
INTRODUCCION	1
LIPIDOS INTERMEDIARIOS	1
Algunos sistemas en que se ha determinado la naturaleza del lípido	2
Características de los prenoles	4
Estructura	4
Nomenclatura de poliprenoles	7
Propiedades de los prenil fosfato	8
Sistemas en los que se han descrito lípido-azúcares	9
Biosíntesis de la región central del LPS	18
Biosíntesis del polisacárido O	19
Modificación del polisacárido O	22
Función de los "lípidos intermediarios"	24
Vitaminas A y K	26
ANTECEDENTES RECIENTES Y OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION	28
MATERIALES Y METODOS	32
Medio de cultivo, condiciones de crecimiento y obtención de células de Acetobacter xylinum	32
Preparación de enzima de Acetobacter xylinum	34
Preparación de enzima de arveja	36
Sistemas de incubación	36
a) Con enzimas de Acetobacter xylinum	36
b) Con enzima de arvejas	39
Tratamientos degradativos	40
Tratamientos enzimáticos	42
Cromatografía en columnas de DEAE-celulosa	43
Cromatografía en capa delgada	43
Cromatografía y electroforesis en papel	46
Métodos analíticos	47
Productos químicos	48
Medida de la radioactividad	57



RESULTADOS	59
Incorporación a partir de UDP-Glu	59
Análisis de los productos solubles en butanol	65
Incorporación a partir de UDP-Gal	69
Preparado enzimático	70
Análisis del producto	79
Tratamiento fenólico	81
Reducción catalítica	83
Confirmación de que el FMP es sustrato	84
Extracción del aceptor de <i>Acetobacter xylinum</i>	100
Análisis de extractos lipídicos de <i>A. xylinum</i> por espectrografía de masa	104
Activación por otros extractos lipídicos	106
Estimulación de la formación de Lípido-PP-Glu por el agregado de FMP	109
Análisis del producto	112
Estimulación de la síntesis de polímero	114
Aceptores de galactosa	119
Enzimas relacionadas	123
Prenol quinasa	124
Poliprenol pirofosfatofosfatasa	127
Aceptores lipídicos en plantas	130
Análisis de pico 2	133
Aceptor endógeno	134
DISCUSION	138
Incorporación a partir de UDP-Gal	139
Otros aceptores lipídicos	141
Estudio del aceptor aislado de <i>A. xylinum</i>	142
Síntesis de Lípido-PP-Glu	144
Estudio de algunas enzimas del ciclo biosintético del aceptor lipídico	146
Aceptores de galactosa	148
Aceptores lipídicos en plantas	148
CONCLUSIONES	151
BIBLIOGRAFIA	155

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Marcelo A. Dankert por su constante apoyo, sentido crítico y conocimientos brindados en todo momento desde mi ingreso a su laboratorio.

Al Dr. Luis F. Leloir por haberme permitido elegir el lugar de trabajo y por su decidido apoyo en las prórrogas de beca de la Organización de los Estados Americanos.

Al Dr. Carlos E. Cardini por sus valiosos consejos y apoyo brindado durante la ejecución de esta tesis.

A la Universidad Católica de Valparaíso por su respaldo en la obtención de la beca de la Organización de los Estados Americanos y por haberme concedido licencia durante el periodo requerido para llevar a cabo este trabajo.

A la Organización de los Estados Americanos por los 3 años de beca otorgada.

A la Fundación Bariloche por haber financiado parcialmente este trabajo.

Al Dr. H. Niemeyer sin cuyo apoyo las prórrogas de la beca de la Organización de los Estados Americanos no hubieran sido posibles.

A Rodolfo C. García mi reconocimiento por su amistad y valiosa colaboración prestada.

Al Ing. R. Pont Lezica, al Dr. Horacio G. Pontis y a los demás miembros del Departamento de Biología de la Fundación Bariloche, por su apoyo y estímulo durante la redacción de este trabajo.

A los Dres. V. Campos y P. Sotomayor por el estímulo brindado durante mi estadía en la Argentina.

A mis amigos O. Burrone, R. Couso, G. Daleo, G. Echandi y Nora Liñón por los agradables momentos compartidos durante el transcurso de mi trabajo.

A todos los miembros del Instituto de Investigaciones Bioquímicas por su cooperación y críticas.

A Francisco Irusta y Soledad de Jimenez por su eficiente colaboración.

A Manon Scarth cuya dedicación posibilitó la transcripción de esta tesis.

ABREVIATURAS

abe	abecucosa
acglu	ácido glucurónico
ADP	5' adenosina difosfato
ATP	5' adenosina trifosfato
ATP-asa	adenosina trifosfatasa
Az	azúcar
cel	celobiosa
cpm	cuentas por minuto
DEAL-celulosa	dietil amino etil celulosa
Dol	dolicol
DolMP	dolicol monofosfato
EDTA	ácido etilen diamin tetraacético
F	ficaprenol
FMP	ficaprenol monofosfato
Fr	frente
fuc	fucosa
gal	galactosa
gli	glicerol
glu	glucosa
LPS	lipopolisacárido
man	manosa
Nacglu	N-acetilglucosamina
Nacman	N-acetilmanosamina
Nacmur	ácido N-acetilmurámico
Nacneu	ácido N-acetilneuramínico, o ácido siálico.

NDP-Az	nucleótido difosfato azúcar
nmoles	nano moles
Or	origen
PDTLA	fosfato de dietrietilamina
Pi	fosfato inorgánico
pmoles	pico moles
PPi	pirofosfato inorgánico
prot	proteína
ram	ramosa
$R_i$	relación de la movilidad de la sustancia con el frente del solvente
$R_{PPi}$	relación de la movilidad de la sustancia a la movilidad del pirofosfato
Tris	Tris (hidroximetil amino) metano
uCi	micro curies
UDP	5' uridina difosfato
UDP-Gal	5' uridina difosfato galactosa
UDP-Glu	5' uridina difosfato glucosa
UMP	5' uridina monofosfato
ug	micro gramos
umoles	micro moles
xil	xilosa



## RESUMEN

a) En *A. xylinum* se había descrito la formación de glicofosfolípidos de acuerdo a las siguientes reacciones:



El Lípido-P formaba parte del preparado enzimático utilizado. En este trabajo se demuestra que en ambos casos el lípido es un poliprenol alílico, muy probablemente undecaprenol. Ello se logró utilizando un preparado enzimático y las condiciones adecuadas para formar estos compuestos, a partir de Lípido-P exógeno de estructura conocida. Tanto Ficaprenol-P (FMP) como Dolicol-P (DolMP) actúan como sustratos en la reacción 1), aunque las propiedades de los productos formados son diferentes: Solamente el sintetizado con FMP se comporta como el obtenido con el Lípido-P endógeno, frente a tratamientos tales como reducción catalítica o degradación con fenol.

También se aisló el Lípido-P endógeno y se lo purificó por cromatografía en columnas de DEAE-celulosa. Sus propiedades son análogas a las del FMP y algo diferentes de las del DolMP. El análisis por espectrografía de masa de este lípido endógeno confirmó su naturaleza poliprenólica pero no permitió establecer inequívocamente su estructura.

En la reacción 2) solamente se logró utilizar el FMP como sustrato exógeno.

b) En los mismos preparados enzimáticos de *A. xylinum* se detectó también la presencia de las siguientes actividades enzimáticas, vinculadas al metabolismo de los prenil fosfatos:



La reacción 3) sería catalizada por una prenil pirofosfato fosfatasa y la 4) por una prenil quinasa.

c) Utilizando este mismo organismo se intentó aislar polisacáridos que contuvieran galactosa. Ello no se logró, pero en cambio se pudo caracterizar parcialmente cuatro polisacáridos: 2 neutros y 2 aniónicos.

d) Finalmente se investigó la presencia de glicofosfolípidos en plantas.

El sistema utilizado (epicotilos de arveja, *Pisum sativum*), en presencia de UDP-Glu, permitió aislar un compuesto con las propiedades del DolMP-Glu.

El Lípido-P aceptor es endógeno, pues se encuentra en el preparado enzimático y la reacción se puede representar en la siguiente forma:



Las propiedades del Lípido endógeno-P son similares a las del DolMP y diferentes de las del FMP.

La función de este Lípido-P glucosilado se desconoce, pero posiblemente participe en la síntesis de polisacáridos y/o glicoproteínas.

## INTRODUCCION

### I. LIPIDOS INTERMEDIARIOS

En la síntesis del glucógeno (1-4), del almidón (5-8) y de otros polisacáridos (9-11), un azúcar activado, o nucleótido-azúcar, cede su resto glicosilo a un aceptor que en general es el mismo polisacárido.

La Figura 1 ilustra el caso del glucógeno.

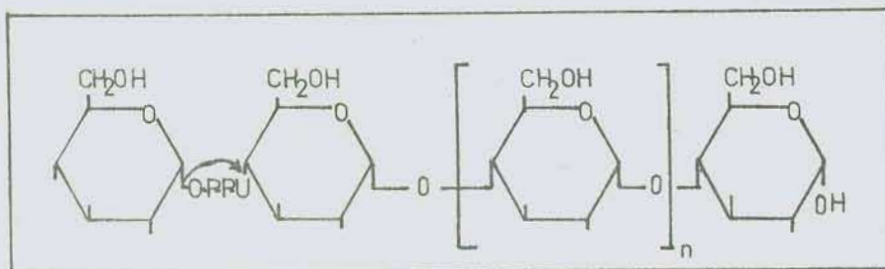


Figura 1: Síntesis del glucógeno

Aunque este esquema sigue manteniendo su vigencia, en algunos casos, a partir de mediados de la década del 60 (12-14),



surgió otro requerimiento, el de los compuestos llamados "lípidos intermediarios".

Como su nombre lo indica la función de estos compuestos es "mediar" en la síntesis de algunas macromoléculas tal cual se ve en forma muy general en la secuencia de reacciones siguiente:



El aceptor final puede ser un polisacárido (glicopéptido, lipopolisacárido, etc.) o una glicoproteína. La unión del lípido al azúcar se efectúa a través de un puente mono o difosfato.

Aunque estos compuestos fueron originalmente descritos en relación a la síntesis de polisacáridos complejos de la pared bacteriana (12-14) su radio de acción se extendió pronto a otros sistemas tanto en procariotes (15-17) como en eucariotes (17-19).

En todos los casos descritos la acción la desarrollan en sistemas asociados de una u otra forma a membranas, para lo cual su naturaleza lipofílica los hace perfectamente aptos. Su papel sería equivalente al de los nucleótido-azúcares en cuanto a que ceden su resto glicosilo a un aceptor, pero la reacción se desarrollaría en un medio lipofílico.

#### Algunos sistemas en que se ha determinado la naturaleza del lípido.

A los pocos años de su descubrimiento, más exactamente en 1967, en forma casi simultánea en los laboratorios de Robbins (20) y Strominger (21) gracias al uso de la espectrografía de masas, se pudo determinar la estructura de la porción lipídica de los "lípidos

intermediarios" involucrados en la síntesis del polisacárido O y de la mureína o pared celular respectivamente.

Al analizar los espectros se vió que correspondían a compuestos de naturaleza prenólica, concretamente al undecaprenol.

Posteriormente y siempre en procariotes se determinó también por espectrografía de masas la estructura prenólica de la parte lipídica de los lípido-fosfato y difosfato azúcares en los sistemas que aparecen en la Tabla 1.

Tabla 1. Sistemas procarióticos en los que se ha determinado la estructura de la parte lipídica de los lípido-azúcares.

Sistema	Referencia
Manano en <i>M. lysodeikticus</i>	(22)
Manolípido en <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (*)	(23)
Manolípido en <i>Mycobacterium smegmatis</i> (*)	(24)
Modificación polisacárido O en <i>Salmonella</i>	(25)
Polisacárido capsular en <i>Aerobacter aerogenes</i>	(26)
Polímero del ácido siálico en <i>E. coli</i> K 235	(27)
Peptidoglicano en <i>E. coli</i>	(28)
Peptidoglicano en <i>Staphylococcus aureus</i>	(29)

(\*) Con excepción de los manolípidos de micobacterias todos los demás lípido-azúcares que aparecen en la tabla cumplen funciones de intermediarios.

También en eucariotes se ha descrito la existencia de intermediarios de tipo prenólico.

Behrens y Leloir (30) señalaron la existencia de doliquil monofosfato glucosa en hígado de rata.

La Tabla 2 muestra los sistemas y métodos con que se ha dilucidado la naturaleza de la fracción lipídica de dichos intermediarios.

Tabla 2. Sistemas en los que se ha determinado la naturaleza del lípido en eucariotes.

Sistema	Métodos	Referencia
Manolípido en <i>Aspergillus niger</i>	Precursores radioactivos	(31)
Manolípido en hígado de cerdo	IR, RMN y estudios comparados con un compuesto similar obtenido químicamente.	(32)
Manolípido en hígado bovino	E. de masas	(33)
Manolípido en hígado de rata	Precursores radioactivos	(34)
Manano en levadura <i>S. cerevisiae</i>	E. de masas.	(35)

#### Características de los prenóles

Estructura.— Los poliprenóles son polímeros lineales del 2-metil-2-butenó, o isopreno, que llevan un grupo hidroxilo en el extremo no ramificado de la cadena hidrocarbonada. Su fórmula aparece en la Figura 2.

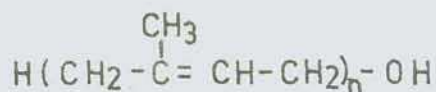


Figura 2: Fórmula general de los poliprenoles.

A partir de ella se pueden señalar algunas características:

- a) El número de unidades isoprénicas (n) fluctua entre 5 y 24 (17).
- b) Existen variaciones con respecto al grado de saturación de las unidades.

Ambas variables se pueden determinar mediante E. de masas.

- c) Al poseer dobles enlaces, dan origen a isómeros cis, trans y mezclas de ambos. Aunque en la naturaleza existen compuestos con todas las dobles ligaduras trans como la gutapercha (36, 37), el solanesol (38) y el espadicol (39) o todas cis como el caucho (36, 37), parece ser que los poliprenoles con funciones de intermediarios poseen ambos tipos de enlace (17).

Para determinar el número de residuos isoprénicos en configuración cis o trans se utiliza la espectrografía de resonancia magnética nuclear (40) combinada con la espectrografía de masas. Mediante la primera se conoce la relación cis/trans y con la segunda el largo de la cadena y el número de insaturaciones, como ya se indicó.

El uso del espectrógrafo de resonancia magnética nuclear (RMN) plantea tres limitaciones:



- La gran cantidad de sustancia que se debe utilizar.
- No da información con respecto a la ubicación de los dobles enlaces cis y trans.
- El equipo debe ser muy sensible.

Estas dificultades han sido obviadas en algunos casos mediante la biosíntesis del poliprenol a partir de precursores estereoespecíficamente marcados (17, 41, 42). La utilidad de este método ha resultado limitada debido a problemas de permeabilidad celular (17). Un resumen con las características señaladas para algunos de los prenoles conocidos aparece en la Tabla 3.

Tabla 3. Prenoles de diferentes fuentes naturales (43).

Nombre	Fuente natural	n	Uniones trans	Isoprenos saturados	Referencia
Solanesol	hojas de tabaco	9	3	0	(38)
Espadicol	A. maculatum	10	9	0	(39)
Castaprenol	hojas de castaño	10 - 13	3	0	(44)
Ficaprenol	hojas de gomero	10 - 13	3	0	(45)
Heveaprenol	hojas de hevea	10 - 13	3	0	(46)
Betulaprenol	hojas de abedul	10 - 13	3	0	(47)
	madera de abedul	6 - 9	2	0	(48)
Bactoprenol(*)	L. casei	11	-	1	(49)
Decaprenol	M.tuberculosis	10	-	0	(23)
	M.smegmatis	10	-	0	(24)
Undecaprenol	S.newington	11	+	0	(20)
	M.lysodeikticus	11	2	0	(21, 22)
	Salmonella	11	-	0	(25)
	A.aerogenes	11	-	0	(26)
	L.plantarum	11	2	0	(50)
	E.coli	11	-	0	(27, 28)
	S.aureus	11	2	0	(29)
	S.faecalis	11	2	0	(51)
Dolicol	A.niger	19 - 23	2	3	(52)
	A.fumigatus	19 - 23	2	3	(53)
	levaduras	14 - 18	2	1	(17, 35, 46)
	P.cactorum	14 - 16	2	1	(54)
	invertebrados	17 - 21	-	1	(55)
	marinos				
	mamíferos	17 - 21	2	1	(56, 57)

(\*) Posiblemente sea idéntico al undecaprenol. Parece no tener isoprenos saturados (Heming, comunicación personal).

De la tabla se desprende que aparte de los compuestos con todas las uniones trans, al haber mezclas de enlaces cis y trans los que predominan son los cis existiendo 3 enlaces trans en los prenoles vegetales (salvo el betulaprenol extraído de la madera) y 2 en todos los demás casos.

Nomenclatura de poliprenoles.— La nomenclatura tradicional hace referencia por un lado a la fuente de donde se los aisló. Por ejemplo, ficaprenol, porque se purificó de las hojas del gómero, Ficus elástica; castaprenol, porque se obtuvo del castaño etc; y por el otro, al largo de cadena, por ejemplo, undecaprenol, dodecaprenol, dolicol (del griego dolikos = largo), etc.

La denominación se completa asignando la letra griega  $\alpha$  a la unidad isoprénica que lleva el hidroxilo y la letra  $\omega$  (omega) a la unidad del extremo ramificado.

Los principales defectos de que adolece esta nomenclatura son:

- Dice muy poco con respecto a las características químicas (ejemplo: número de saturaciones, ubicación de sustituyentes...) y estereoquímicas (ejemplo: tipo y ubicación de los dobles enlaces).
- Aún cuando sus propiedades permitan agruparlos, al crecer el número de fuentes de donde se los extrae crece en forma paralela el número de nombres (17).
- Debido a las dificultades enunciadas Hemming (17) propuso una nomenclatura basada en la que la IUPAC recomienda para las quinonas poliisoprenoideas.

En dicha nomenclatura se indica con números arábigos el largo de la cadena, en unidades isoprénicas, y con números romanos la

presencia, en la respectiva unidad repetitiva, de sustituyentes, saturaciones o dobles enlaces trans. Ejemplos:

IX, X ditrans, policis, prenol 11 = undecaprenol

VIII, IX, X tritran, policis, prenoles 11-12 = ficaprenol.

Por razones de simplicidad en el desarrollo de este trabajo se seguirá usando la nomenclatura tradicional.

#### Propiedades de los prenil fosfatos.

Una de las características distintivas es su estabilidad frente a tratamientos alcalino suaves, lo que posibilita su separación de los fosfolípidos con los cuales se co-extrae (58).

La presencia o no de un doble enlace en la unidad  $\alpha$  es decir, la que lleva el grupo alcoholico, permite, clasificarlos en ésteres alílicos (con doble enlace) y  $\alpha$ -saturados (sin él).

En la Figura 3 aparecen en forma esquemática los dos tipos de compuestos.

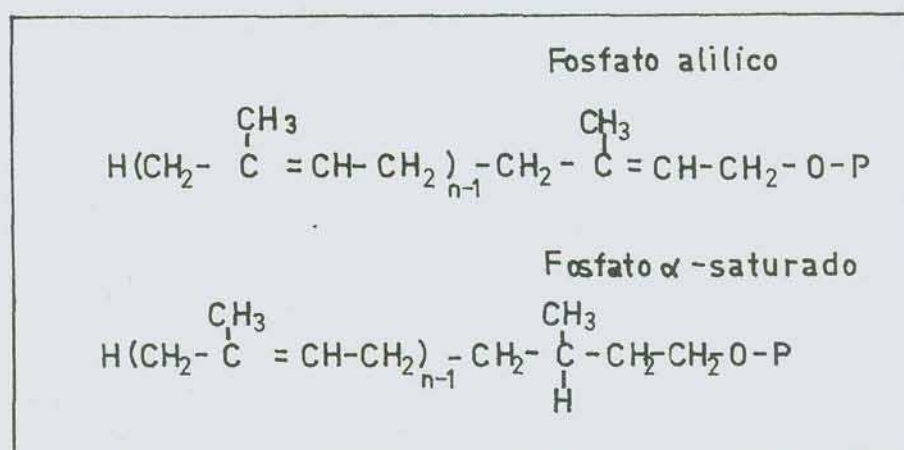


Figura 3: Ésteres alílicos y  $\alpha$ -saturados.



Como se observa ambos poseen un grupo fosfato unido a un alcohol primario, pero se diferencian por la presencia o ausencia de la doble ligadura en el carbono vecino al que lleva la función alcohólica. Esta insaturación hace que el resto fosfórico sea más lábil a ciertos reactivos (ácido suave, reducción con  $H_2$ , fenol).

En forma general, como ya se indicó, a los derivados con una doble ligadura en la unidad  $\alpha$  se los llama alil derivados y, por ser el éster fosfórico del dolicol el más estudiado de los derivados  $\alpha$ -saturados, a estos se les suele llamar comunmente derivados dolicolícos.

#### Sistemas en los que se han descrito lípido-azúcares

En la Tabla 4 se reseñan algunos de los sistemas en los que se han descrito lípido-fosfo-azúcares.

Tabla 4. Sistemas en los que se han descrito lípido-fosfo-azúcares.

##### (A) Procariotes

Lípido	Fuente	Referencia
-P-man	<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	(59)
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	(23)
	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	(24, 60)
-P-glu	<i>Salmonella</i>	(25, 61, 62)
	<i>Shigella flexneri</i>	(63)
	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	(64)
	<i>Bacillus licheniformis</i>	(65, 66)
	Mutante de <i>E. coli</i>	(67)



-P-gal	Acetobacter xylinum	(68)
-P-Nacneu	Escherichia coli	(27)
-PP-gal	Salmonella newington	(20)
	Salmonella typhimurium	(13, 15)
	Aerobacter aerogenes	(26)
-PP-glu	Klebsiella aerogenes	(69, 70)
	Acetobacter xylinum	(68)
-PP-gli	Bacillus licheniformis	(65)
-PP-Nacglu	Staphylococcus lactis	(71, 72)
-P $\delta$ -PP-(man) <sub>2</sub>	Mycobacterium smegmatis	(64)
-PP-(glu) <sub>2</sub>	Acetobacter xylinum	(68)
-PP-gal-ram	Salmonella newington	(20)
	Salmonella typhimurium	(13, 15)
-PP-gal-man	Aerobacter aerogenes	(26)
-PP-glu-gal	Klebsiella aerogenes	(69, 70)
-P-glu-P-gli	Bacillus licheniformis	(65, 66)
-PP-Nacglu-P-gli	Staphylococcus lactis	(71, 72)
-PP-(glu) <sub>3</sub>	Acetobacter xylinum	(73)

-PP-gal-ram-man	Salmonella newington	(20)
	Salmonella typhimurium	(13, 15)
-PP-gal-man-acglu	Aerobacter aerogenes	(26)
-PP-gal-ram-man(abe)	Salmonella typhimurium	(13, 15)
-PP-gal-man-(acglu)gal	Aerobacter aerogenes	(26)
-PP-glu(glu <sub>2</sub> , fuc <sub>3</sub> )	Mutante de E.coli	(67)
-PP-(gal-ram-man) <sub>n</sub>	Salmonella newington	(20)
-PP-(gal-ram-man(abe)) <sub>n</sub>	Salmonella typhimurium	(13, 15)
-PP-(gal-man-(acglu)gal) <sub>n</sub>	Aerobacter aerogenes	(26)
-PP-pentapéptido-Nacmur	Micrococcus, Staphylococcus	(74)
-PP-pentapéptido-Nacmur-Nacglu	Micrococcus, Staphylococcus	(74)
-PP-hexapéptido-Nacmur-Nacglu	Micrococcus	(75)
-PP-decapéptido-Nacmur-Nacglu	Staphylococcus	(76)

(B) Eucariotes

- Levaduras

-P-man	Saccharomyces cerevisiae	(77-79)
	Hansenula holstii	(80)
-P-glu	Saccharomyces cerevisiae	(81)
-P-2-deoxiglu	Saccharomyces cerevisiae	(82)
-PP-Nacglu	Saccharomyces cerevisiae	(83)
-PP-(Nacglu) <sub>2</sub>	Saccharomyces cerevisiae	(83)
-PP-oligosacárido	Saccharomyces cerevisiae	(83)

- Hongos

-P-man	Aspergillus niger	(31,84)
--------	-------------------	---------

- Protozoos

-P-glu	Tetrahymena piriformis	(85)
-PP-oligosacárido	Tetrahymena piriformis	(86)

- Vegetales

-P-man	Phaseolus aureus	(87-92)
	Phaseolus vulgaris	(93)
	Raiz de tomate	(90)
	Codium fragile	(90)
	Fibra de algodón	(94)
	Pisum sativum	(95)
-P-glu	Fibra de algodón	(94)
-PP-Nacglu	Phaseolus aureus	(91, 92)
-PP-(Nacglu) <sub>2</sub>	Fibra de algodón	(96)
	Phaseolus aureus	(91, 92)
-PP-oligosacárido	Fibra de algodón	(96)
	Phaseolus aureus	(91, 92)

- Insectos

-P-glu	Triatoma infestans(+)	(97)
	Ceratitis capitata	(98)
-P-man	Ceratitis capitata	(98)
-PP-Nacglu	Triatoma infestans(+)	(97)
	Ceratitis capitata	(98)

- Aves

-P-man	Oviducto de gallina	(99-101)
	Células de oviducto	(102)
	Retina de embrión de pollo	(103)
	Hígado de embrión de pollo	(104)
	Cerebro de embrión de pollo	(105)
-P-glu	Oviducto de gallina	(101)
	Cerebro de embrión de pollo	(105)
-P-xil	Oviducto de gallina	(101)
-PP-(Nacglu) <sub>2</sub>	Oviducto de gallina	(106)
-PP-oligosacárido	Oviducto de gallina	(101,106,107)
	Células de oviducto	(102)

- Mamíferos

-P-man	Hígado de conejo	(99)
	Hígado de rata	(99,108)
	Hígado de cobayo	(99)
	Hígado de cerdo	(109)
	Hígado bovino	(33)
	Hígado de hamster	(110)
	Cerebro de rata	(108)
	Cerebro de ratón	(111)

	Cerebro de ternera	(112)
	Aorta bovina	(113)
	Aorta de cerdo	(114)
	Tiroides bovina	(100)
	Mieloma	(33,99)
	Pancreas de ternero	(115,116)
	Linfocitos humanos	(117,118)
	Parótida de rata	(119)
	Médula adrenal bovina	(119)
	Células normales y transformadas (fibroblastos de ratón)	(120)
-P-man (Retinol) (*)	Hígado de rata	(34,121-123)
	Hígado de hamster	(110)
-P-glu	Hígado de rata	(30,124)
	Cerebro de rata	(108,124)
	Linfocitos humanos	(117)
-P-gal	Hígado de vaca	(125)
-P-gal (Retinol) (*)	Mastocitoma de ratón	(126,127)
-PP-Nacglu	Hígado de conejo	(122)
	Hígado de rata	(129)
	Hígado de cerdo	(130)
	Hígado de vaca	(131)
	Aorta bovina	(132)
	Aorta de cerdo	(132)
	Pancreas de ternera	(133)

-PP-Nacglu (Vit. K) (*)	Hígado de rata	(134)
-PP-Nacman	Hígado de cerdo	(130)
	Hígado de rata	(130)
-PP-(Nacglu) <sub>2</sub>	Hígado de rata	(129)
	Hígado de cerdo	(135)
	Hígado de vaca	(131)
	Aorta bovina	(132)
	Aorta de cerdo	(132)
	Pancreas de ternera	(136)
-PP-(Nacglu) <sub>2</sub> (Vit. K) (*)	Hígado de rata	(134)
-PP-oligosacárido	Hígado de rata	(137,138)
	Hígado de cerdo	(139-141)
	Hígado de vaca	(131)
	Cerebro de rata	(139)
	Cerebro de ternera	(112)
	Aorta bovina	(113)
	Aorta de cerdo	(114)
	Células de aorta de ternera	(142)
	Riñón de rata	(139)
	Parótida de rata	(119)
	Mieloma de ratón	(143)
	Médula adrenal bovina	(119)
	Tiroides de cerdo	(139)
	Linfocitos humanos	(139,144)

(+) Se utilizó para su síntesis enzima de hígado de rata

(\*) En estos casos el lípido ha sido identificado con el compuesto que figura entre paréntesis.



De todos los sistemas mencionados en la tabla se describirá con cierto detalle la síntesis del polisacárido O de Salmonella por ser un sistema muy estudiado y por lo tanto un buen modelo.

El polisacárido O forma parte de una macromolécula compleja, el lipopolisacárido (LPS), que existe asociada a la pared de muchas bacterias Gram negativas.

Su estructura química ha sido estudiada especialmente en Salmonella (145, 146).

En la Figura 4 aparece representada esquemáticamente la molécula de LPS.

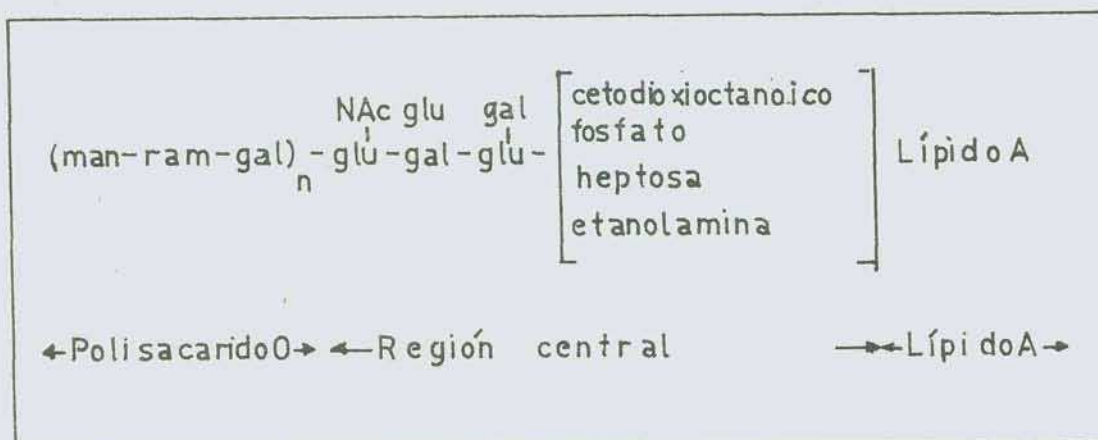


Figura 4: Esquema del LPS en Salmonella (43).

En general se consideran 3 regiones diferentes dentro de la molécula:

El lípido A, la región central y el polisacárido O.



Solo se mencionará la biosíntesis de la región central y del polisacárido O, ya que la síntesis del lípido A aun no está dilucidada.

La región central y el polisacárido O están bajo un control genético independiente (147) y todos los estudios indican que el LPS se sintetiza en la membrana plasmática (148).

Biosíntesis de la región central.— La síntesis de la región central sigue en cierto modo el esquema clásico, es decir, los nucleótido-azúcares adecuados ceden secuencialmente su resto glicosilo al extremo no reductor de la cadena creciente del polisacárido (10, 149). Pero para que esto ocurra es necesaria la presencia de un fosfolípido, la fosfatidiletanolamina (150, 151) que permite formar la matriz adecuada para que interactúe el polisacárido aceptor con la enzima, formando un complejo ternario capaz de reaccionar con el nucleótido-azúcar correspondiente. La fosfatidiletanolamina no participa directamente en la reacción (149, 151).

La secuencia de reacciones de la Figura 5 esquematiza este proceso:

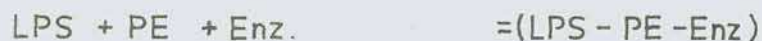


Figura 5: Esquema biosíntesis región central del LPS.

LPS = lipopolisacárido; PE = fosfatidiletanolamina; Enz = enzima y NDP-Az = nucleótido-difosfato-azúcar.

Biosíntesis polisacárido O.— Muchos grupos de investigadores han estudiado el polisacárido O de *Salmonella* desde un punto de vista tanto químico como serológico o biosintético (145, 146).

En *salmonella anatum*, *newington* e *illinois* esto ha sido particularmente estudiado por Robbins y col. (152-155).

Al analizar el polisacárido O de dichas cepas Robbins y col vieron que ésta era una molécula compleja formada por varios azúcares. Observaron también que a pesar de la complejidad mencionada, los azúcares no estaban unidos al azar sino de una forma bien determinada, y que un grupo de azúcares se repetía a lo largo de la estructura; esto hizo posible la introducción de un nuevo concepto en polisacáridos: el de unidad repetitiva. En la Figura 6 aparece la unidad repetitiva del polisacárido O en *Salmonella newington*.

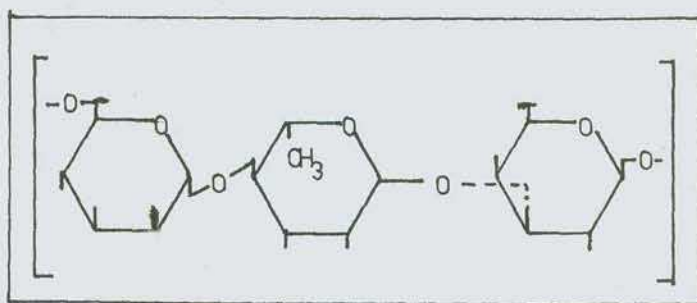


Figura 6: Unidad repetitiva del polisacárido O de *S. newington* (58).

Uno de los sistemas donde se describió por primera vez la presencia de prenifosfatos fue precisamente en la biosíntesis del polisacárido O (20).

Los estudios señalados llevaron al esquema biosintético de la Figura 7.

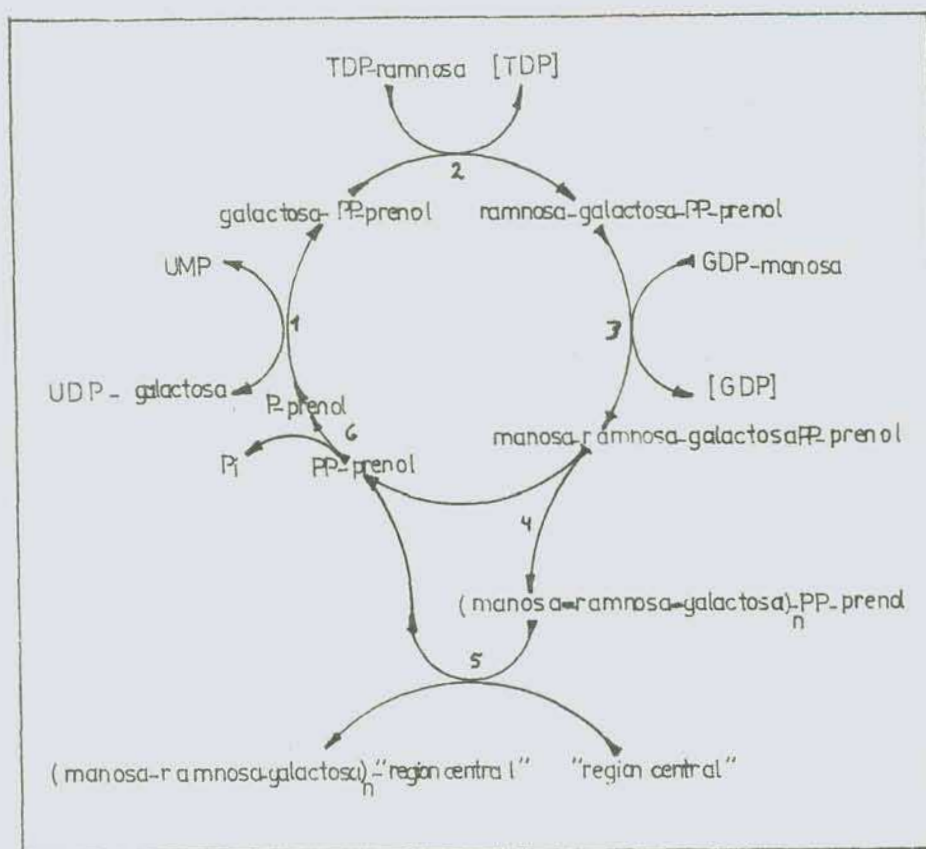


Figura 7: Biosíntesis del polisacárido O en *S. newington* (20, 43)

Este proceso (Figura 7) puede dividirse en 3 etapas (155):

- 1) Síntesis de un prenil-PP-oligosacárido (lípid-PP-gal-ram-man), es decir, de la unidad repetitiva.
- 2) Polimerización de la unidad repetitiva unida al lípido.
- 3) Transferencia del polisacárido formado sobre el lípido a la región central del lipopolisacárido.

Merece destacarse que en la reacción 1 el UDP-Gal cede Gal-1-P y no Gal al prenil-P aceptor formándose el Prenil-PP-Gal y que esta reacción es reversible.

Las reacciones 2 y 3 siguen el esquema clásico y una vez formada la unidad repetitiva esta se polimeriza sobre el lípido dando origen al polisacárido 0. La función de los lípidos intermediarios sería entonces no solo adaptarse a un medio hidrofóbico sino también facilitar el montaje de la unidad repetitiva como etapa previa a la polimerización.

Otra novedad del sistema consistió en que a diferencia de lo que sucede en la síntesis de otros polisacáridos el crecimiento de la cadena es por el extremo reductor (156) tal cual se ve esquemáticamente en la Figura 8. Es decir la cadena oligosacárida creciente

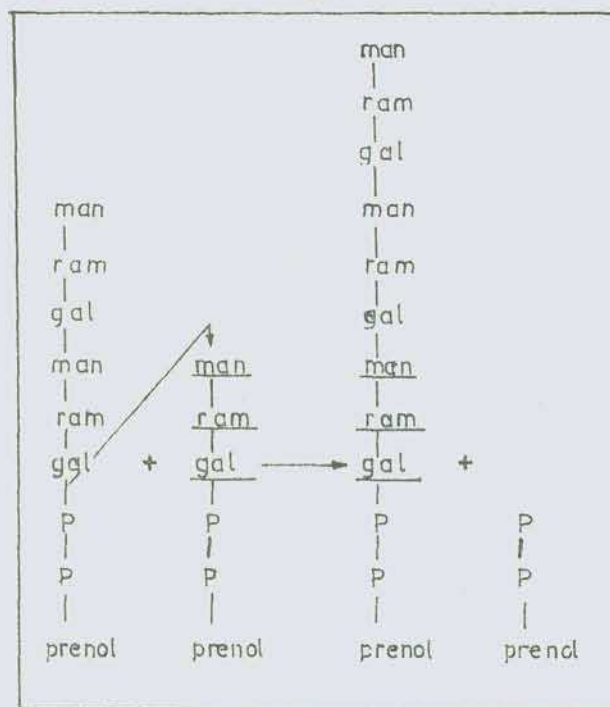


Figura 8: Mecanismo de polimerización del polisacárido 0 (156).



es transferida a una nueva unidad repetitiva a semejanza de lo que sucede en la síntesis de polipéptidos y ácidos grasos.

La reacción 6 fué estudiada especialmente en la biosíntesis de la mureína o pared celular (157). Participa una fosfatasa que quita un fósforo al prenil difosfato, lo cual le permite al lípido entrar nuevamente en el ciclo. Dicha enzima es específicamente inhibida por la bacitracina (158, 159).

Se ha señalado la presencia de una segunda fosfatasa que lleva al prenil monofosfato a alcohol libre (160) y de una quinasa que hace la reacción inversa, es decir, fosforila el prenol (161).

Esquemas análogos al presentado han sido descritos para la síntesis del polisacárido O en *Salmonella typhimurium* (13, 15), del peptidoglicano o pared celular (12, 15, 21), y de un polisacárido en *Aerobacter* (26).

Modificación del polisacárido O.— En algunos sistemas formados por unidades repetitivas tetraméricas, en que uno de los azúcares forma una rama lateral, tales como las unidades que intervienen en la síntesis del polisacárido O en *Salmonella typhimurium* (Figura 9) (15), o en la síntesis de un polisacárido capsular en *Aerobacter* (26)

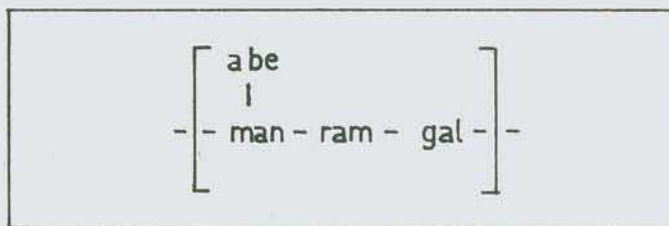


Figura 9: Unidad repetitiva en *S. typhimurium* (15)

el azúcar de la ramificación es cedido por un nucleótido-azúcar en presencia de la transferasa respectiva.

En *Salmonella typhimurium*, se ha demostrado que in vitro la abecuesa solo se incorpora cuando el trisacárido man-ram-gal está unido al prenil pirofosfato. Una vez producida la polimerización el polisacárido formado deja de ser sustrato para la abecuosis transferasa (162).

Existen sin embargo otros sistemas en los cuales la rama glicosídica lateral no es cedida por el nucleótido-azúcar sino por un lípido monofosfato azúcar (25, 61, 62). El caso mejor estudiado y el primero descrito es el de la síntesis del polisacárido O en *Salmonella minneapolis*, en donde Wright (25) demostró que la rama lateral de glucosa se incorpora de acuerdo a la secuencia de reacciones siguiente:



Nuevamente acá aparece un prenil fosfato, pero a diferencia de lo visto en los ciclos biosintéticos del tipo descrito para el polisacárido O, el lípido está unido al resto glicosilo por un puente monofosfato. El lípido resultó ser también undecaprenol, indistinguible con los métodos actuales del que participa en la síntesis del polisacárido O. En la reacción 2 el aceptor más probable sería un hexa o nonasacárido unido al undecaprenil difosfato (25).

Sistemas análogos han sido estudiados por Nikaide y col (61, 62) en *Salmonella typhimurium*. Sasaki y col (163) confirmaron los resultados de Wright.

### Función de los "lípidos intermediarios"

Luego de haber visto en forma somera la síntesis de 2 de las 3 partes que componen el LPS se puede decir que en ese caso la naturaleza ofrece dos soluciones diferentes al problema de, a partir de precursores hidrofílicos, sintetizar una macromolécula en un medio lipofílico como es la membrana celular. Estas dos soluciones son:

- a) Mediante un fosfolípido, la fosfatidiletanolamina, que provee el medio hidrofóbico necesario, pero no participa directamente en las reacciones que dan origen a la región central de la molécula.
- b) Mediante el undecaprenil fosfato que participa directamente en el ciclo biosintético del polisacárido O.

En este último caso existen dos tipos de unión azúcar--prenol que parecen cumplir funciones diferentes. Si el puente es difosfato, permite la formación de polímero. Si la unión es a través de un solo fosfato, se agregan azúcares al oligómero o polímero ya formado.

En general los azúcares unidos mediante el enlace difosfato dan origen a la formación de la cadena principal de la macromolécula como se vio en la biosíntesis del polisacárido O.

Una excepción sería la síntesis de un ácido teicoico en *Bacillus licheniformis* (Tabla 4). En este caso un lípido unido al azúcar a través de un monofosfato da origen al polímero. Los ácidos teicoicos son macromoléculas asociadas a la pared de algunas bacterias Gram positivas. Fueron descritos por primera vez por Armstrong y col (164) y los más comunes son derivados del poli(glicerol fosfato) y poli(ribitol fosfato). El grupo de Baddiley describió la



existencia de intermediarios lipídicos en la biosíntesis de algunos de ellos, (Tabla 4). Pero por otra parte Glaser y col (165) no han encontrado pruebas de que en la síntesis de los ácidos teicoicos que han estudiado participen lípidos prenólicos. En cambio han propuesto un nuevo tipo de intermediario: el ácido lipoteicoico (166) cuya parte hidrofílica es poli(glicerol fosfato) y la hidrofóbica está constituida por hexosas esterificadas con ácidos grasos (167).

Otra probable excepción la constituye el sistema de biosíntesis del ácido colomínico (27) en donde un lípido-monofosfato-oligosacárido daría origen a la cadena principal, pero en este caso ya el nucleótido-azúcar dador es un monofosfato, el CMP-siálico.

En eucariotes también se ha demostrado en varios casos la formación de un oligosacárido unido a un lípido a través de un difosfato (17, 19). Pero a diferencia de los procariotes el oligo se transfiere a una proteína y no a un polisacárido (18, 19, 102).

Los prenil-monofosfato-azúcares parecen desempeñar funciones algo diferentes de los difosforilados. Se unen solamente a un azúcar y no forman un oligosacárido (con la excepción ya mencionada del ácido colomínico). En procariotes participan en la modificación de la cadena principal adicionando azúcares a una cadena ya formada sobre un lípido difosfato (25, 61, 62, 168). En eucariotes participan en el agregado secuencial de azúcares, tales como manosa o glucosa a una cadena de oligosacáridos formada sobre el doliquil difosfato.

El requerimiento de un sustrato lipofílico es evidente en la manosilación de un glicopéptido obtenido de tiroglobulina de ternero:



in vitro se logra incorporación directa de manosa, a partir de DolMP-Man, únicamente si el glicopéptido ha sido dinitrofenilado previamente (169). Pero en otro caso el DolMP-Man cede directamente la primer manosa al aminoácido serina (o treonina) de una glicoproteína de levadura (170, 171).

Si se piensa en la analogía señalada al comienzo entre lípido-azúcares y nucleótido-azúcares es de interés señalar que mientras los lípido-difosfato-oligosacáridos conocidos poseen funciones de intermediarios (15-17, 19) no sucede lo mismo con los nucleótido-oligosacáridos descritos (172). La síntesis de un UDP-polisacárido en Tradescantia tal vez sea una excepción (173).

#### Vitaminas A y K

Además de los poliprenoles mencionados anteriormente existe otro derivado del isopreno al cual se le han asignado funciones de intermediario en mamíferos (Tabla 4). Dicho compuesto es el retinol o vitamina A cuya fórmula aparece en la Figura 10.

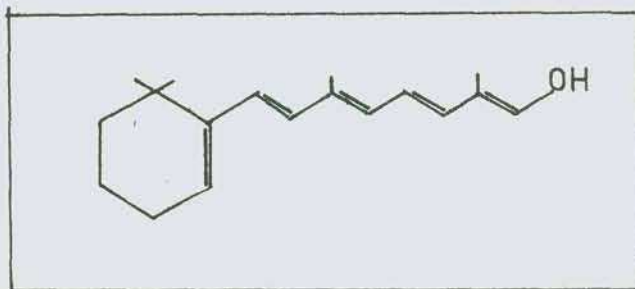


Figura 10: Fórmula del retinol

Como se ve en la Figura 10 a diferencia de los prenoles mencionados antes éste posee un ciclo en el extremo de la cadena.

Este tipo de compuestos ha sido particularmente estudiado por los grupos de Wolf (121-123) y Peterson (126, 127). Piensan que el retinil-monofosfato-azúcar puede ser importante en la glicosilación de algunas proteínas, aunque esto último no ha sido claramente demostrado.

Como en el hígado se forma simultáneamente retinil y doliquil-monofosfato-manosa (34, 110) será de mucho interés determinar si las proteínas que glicosilan son iguales o diferentes.

Finalmente debe señalarse que se han descrito dos lípido-fosfato-azúcares, cuya porción lipídica es la vitamina K (134).

## II ANTECEDENTES RECIENTES Y OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION

Como se indicó al hacer referencia a la Tabla 4, en la mayoría de los casos, en procariotes, los prenil-difosfato-azúcares participan en la formación de la cadena principal de heteropolisacáridos y los prenil-monofosfato-azúcares en la modificación de dichas cadenas.

Resultaba de interés entonces estudiar con algún detalle la biosíntesis de homopolisacáridos vinculados a membranas (68) para ver si en estos sistemas, que no deberían poseer unidades repetitivas del tipo de las del polisacárido O, la naturaleza recurría a lípidos poliprenólicos o poseía otras respuestas.

El sistema elegido como modelo fué el de la biosíntesis de celulosa en bacterias, concretamente en *Acetobacter xylinum*. En este organismo Glaser (174) ya había informado que la celulosa se sintetiza in vitro a partir de UDP-Glu. En este mismo sistema Colvin y col (175, 176) hablaron de la existencia de un "intermediario soluble en alcohol" pero la naturaleza del intermediario no fue establecida con claridad.

Usando un sistema enzimático crudo de células de *Acetobacter* y UDP-( $^{14}\text{C}$ )-Glu como nucleótido-azúcar dador se observó que se incorporaba radioactividad a un glucano y a material liposoluble además de a la celulosa. El material liposoluble obtenido en distintas condiciones fue analizado de diversas maneras. La Figura 11 ilustra un ejemplo.

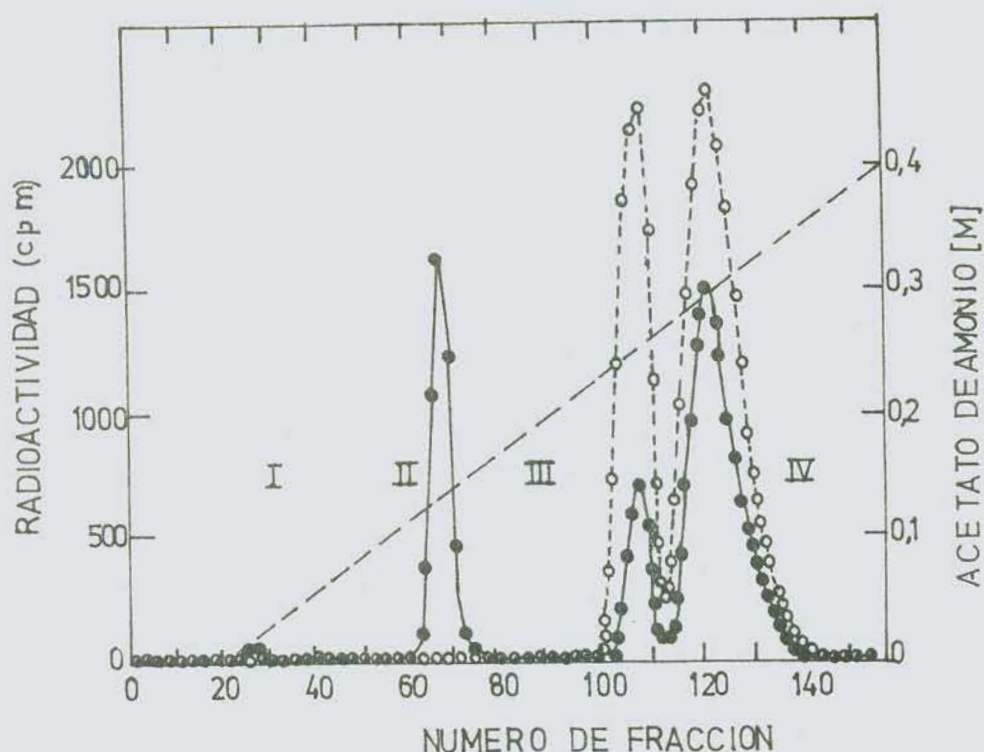


Figura 11: Cromatografía en DEAE-celulosa del extracto butanólico obtenido a partir de UDP-Glu doblemente marcado con (●) ( $^{14}\text{C}$ ) glucosa y (○)  $^{32}\text{P}$  en el fosfato vecino (68).

El material, proveniente de una incubación con UDP-Glu doblemente marcado en  $^{14}\text{C}$  y  $^{32}\text{P}$  se analizó por cromatografía en DEAE-celulosa usando como eluyente un gradiente lineal de acetato de amonio (Materiales y Métodos). El perfil obtenido (Figura 11) reveló la existencia de 3 compuestos dos de los cuales poseían doble marca (68). El análisis de estos compuestos reveló para ellos las siguientes estructuras (68):



Pico II = Lípido-P- $\beta$ -Gal

Pico III = Lípido-PP- $\alpha$ -Glu

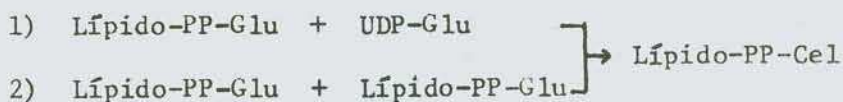
Pico IV = Lípido-PP- $\alpha$ -Celobiosa

Se demostró también que el Lípido-P-Gal y el Lípido-PP-Glu se sintetizan de la siguiente manera:



La presencia de UDP-Gal se justificó suponiendo la existencia de UDP-Gal 4 epimerasa en el preparado enzimático usado.

La síntesis del Lípido-PP-Cel no está aun definitivamente dilucidada ya que existen dos caminos posibles aunque el de la reacción 2) parece más probable (73):



Se debe señalar que por lo menos el Lípido-PP-Glu (y posiblemente el Lípido-PP-Cel) es un intermediario en la síntesis del glucano que, como se indicó anteriormente, se forma al incubar el preparado de *Acetobacter xylinum* con UDP-Glu (73). La función que cumple el Lípido-P-Gal no ha sido aún establecida.

De todos estos compuestos la única porción que permanecía sin dilucidar era la correspondiente al lípido. Determinar su estructura fué el primer objetivo del presente trabajo. En otros sistemas bacterianos el lípido ha resultado ser el undecaprenol (Tabla 3).



Por ello se pensó que probablemente en este caso sucediera lo mismo.

Existían 3 caminos posibles para encarar el problema:

- 1) Utilizar un probable análogo.
- 2) Aislar el lípido endógeno.
- 3) Estudiar la biosíntesis del lípido endógeno a partir de un precursor radioactivo.

La tercera vía se desechó ya que presentaba el problema de la impermeabilidad del *Acetobacter xylinum* al precursor más específico: ácido mevalónico (R.C. García observaciones no publicadas).

Se optó entonces por comenzar aislando un siml de plantas, el ficaprenol, que difiere del undecaprenol en que posee 3 dobles ligaduras trans en lugar de 2 (Tabla 3). El ficaprenol se fosforiló químicamente y se intentó usar como sustrato para ver si estimulaba la síntesis de alguno de los compuestos liposolubles señalados. Este estudio se completó utilizando otros probables aceptores tales como el dolicol-monofosfato e inclusive se trató de aislar el aceptor endógeno de extractos lipídicos de *Acetobacter xylinum*.

- En segundo término se investigó la presencia de otras enzimas vinculadas a estos compuestos.
- Finalmente se estudió la presencia de aceptores lipídicos en plantas.

# MATERIALES Y METODOS

## Medio de cultivo, condiciones de crecimiento y obtención de células de Acetobacter xylinum

El medio de cultivo fué el de Hestrin y col (177) que contiene:

	(% p/v)
Glucosa	2.0
Peptona (Difco u OCLFA)	0.5
Extracto de levadura (Difco o Yeast Product Inc.)	0.5
Fosfato disódico anhidro	0.27
Acido cítrico con 1 mol de agua	0.115

Condiciones de crecimiento.— Se utilizó la cepa de Acetobacter xylinum NRRL B42 cultivada en forma estática a 30°C durante 48 horas en frascos de Roux de 1 litro que contenían 200 ml de medio. Las siembras se hicieron con 20 ml del líquido infranadante de un cultivo de 48 horas. En estas condiciones se forma sobre el medio de cultivo una película que consiste principalmente en celulosa y que contiene en su interior a la mayoría de las células, no obstante, el líquido infranadante contiene también células y se lo puede usar como cultivo iniciador.

La cepa de Acetobacter xylinum NCIB 8747, una mutante que no produce celulosa, se cultivó en el mismo medio y a la misma temperatura pero con agitación (200 RPM) en erlenmeyers de hasta 2 litros ocupados en 1/5 de su capacidad. En estas condiciones el

el tiempo de duplicación de las células 8747 fué de aproximadamente 2 horas.

El mismo medio adicionado de un 5% de agar se utilizó para conservar a 4°C, cultivos de 48-72 horas de ambas cepas. Se hicieron repiques cada 2 ó 3 meses.

Obtención de células con la cepa b42.— Se siguió la técnica de nestring y col (177) ligeramente simplificada. Todas las operaciones se realizaron a temperaturas no mayores de 4°C.

Con la ayuda de una varilla de vidrio se retiraron las películas de los frascos de Roux y se lavaron en grupos de 4 con 200 ml de buffer 0.01 M fosfato-citrato pH 6 (buffer de lavado). Se repitió el lavado y luego las 4 zoogreas se colocaron en una ligadora común, se completó el volumen total a 500 ml con el buffer de lavado, y se homogeneizó durante 1 minuto a velocidad máxima.

A continuación se filtró a través de tela para quesos para quitar la celulosa, y el filtrado, que contenía las células, se centrifugó a 6100 x g (6000 RPM) 15 minutos. El sobrenadante obtenido se usó como fuente de polisacáridos (Aceptores de galactosa). El precipitado se resuspendió en el mínimo de buffer de lavado y centrifugó a 12000 x g (10000 RPM) 5 minutos. Esta operación de lavado y centrifugación se repitió otra vez. Las células se conservaron a -20°C o se procesaron como se señala en Preparación de Enzimas.



Las bacterias de la cepa 8747, que como se indicó no producen celulosa, se cosecharon centrifugando a 8340 x g (7000 RPM) 15 minutos y luego se lavaron con el buffer de lavado en la misma forma señalada para el caso de la cepa B42.

#### Preparación de enzimas de *Acetobacter xylinum*

Se utilizaron varios preparados enzimáticos:

a) Células tratadas con EDTA (68).— Las bacterias lavadas se resuspendieron en buffer 0.01M EDTA-Tris pH 8.0 en una proporción de 2.5 ml de buffer por litro de medio de cultivo y luego se congelaron. Cuando fué necesario usarlas (en ocasiones después de un año) se descongelaron y volvieron a lavar 4 veces con 2 volúmenes de buffer EDTA-Tris pH 8.0. Luego se resuspendieron en 1 volumen del mismo buffer y se volvieron a congelar. Este preparado enzimático conserva su actividad por varios meses.

b) Células toluenizadas (178).— Se utilizaron células tratadas con EDTA, a las que momentos antes de su uso se agregó tolueno al 1% (concentración final). Se las mantuvo 15 minutos a 0°C agitando en vortex cada 3-4 minutos.

c) Células tratadas con lisozima.— Se siguió el método de Costerton y col (179).

d) Particulados obtenidos en celda de French.— Se suspendieron 0.6 gramos de células en buffer 0.07M Tris-HCl pH 8.2 y se pasaron 2 veces por la celda de French a una presión promedio de 10 psi. El material se centrifugó a 480 x g y luego el

sobrenadante se volvió a centrifugar a 18.000 x g. Tanto el precipitado de 480 x g como el de 18.000 x g se suspendieron en buffer 0.07M Tris-HCl pH 8.2. Se usaron ambas fracciones ( $P_{48}$  y  $P_{18}$ ).

e) Particulados obtenidos con el desintegrador de Nossal.— Normalmente se usó la siguiente proporción de sustancias:

0.5 gramos de células húmedas  
2.5 gramos de ballotini (5 micrones).  
5.0 ml de buffer 0.07M Tris-HCl pH 8.2.

La operación se realizó a  $-10^{\circ}\text{C}$  en un tiempo total de 4.5 minutos divididos en 3 periodos iguales de 1.5 minutos, con intervalos de 1 minuto. El material resultante se centrifugó a 480 x g durante 5 minutos para eliminar los ballotini y células sin romper.

El sobrenadante de 480 x g se centrifugó a 30.000 x g 45 minutos obteniéndose un precipitado que se resuspendió en 0.6 ml de buffer 0.07M Tris-HCl pH 8.2, y un sobrenadante que se usó tal cual. Resumiendo este tratamiento produjo 3 fracciones celulares:

- Sobrenadante de 480 x g ( $S_{48}$ )
- Precipitado de 30.000 x g ( $P_{30}$ )
- Sobrenadante de 30.000 x g ( $S_{30}$ )

f) Particulados extraídos con solventes.— Se siguió el método de Troy y col (26) y se usaron para ello 0.050-0.100 gramos de enzima  $P_{30}$ . El método de extracción consistió básicamente en



quitar los lípidos con acetona y butanol y luego lavar las células con acetona y éter etílico, teniendo cuidado de realizar todas estas operaciones a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Finalmente el precipitado se resuspendió en 0.250 ml de buffer 0.07M Tris-HCl, pH 8.2, 0.004M  $\beta$ -mercaptoetanol.

#### Preparación de Enzima de Arveja

Se cultivaron arvejas, *Pisum sativum* variedad cuarentona enana, sobre papel de filtro húmedo, durante 5-7 días a temperatura ambiente en la oscuridad. Se cortaron los tallos y homogeneizaron 1 minuto en Omnimixer (Sorvall) en buffer 0.1M Tris-HCl pH 7.4, 0.02M  $\beta$ -mercaptoetanol y 0.25M sacarosa. Esta y las operaciones siguientes se realizaron a temperaturas no mayores de  $4^{\circ}\text{C}$ . El homogeneizado se filtró por tela para quesos y el filtrado resultante se centrifugó a  $1000 \times g$  15 minutos descartándose el precipitado. El sobrenadante se centrifugó a  $20,000 \times g$  durante 60 minutos y el precipitado obtenido se resuspendió en el mismo buffer; constituyó el sistema enzimático usado (enzima de arveja).

#### Sistemas de incubación

a) Con enzimas de *Acetobacter xylinum*.— Las incubaciones se realizaron normalmente a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos. La mezcla de incubación tipo contenía:

buffer 0.1M Tris-HCl pH 8.2	5 $\mu$ moles
UDP- $(^{14}\text{C})\text{Glu}$ o UDP- $(^{14}\text{C})\text{Gal}$	0.5-0.7 nmoles

MgCl <sub>2</sub>	0.6umoles
EDTA	0.2umoles
Enzima	cantidad indicada en cada caso

El volumen final se ajustó a 0.07 ml con agua.

Cuando se usaron lípidos exógenos, estos se llevaron a seco bajo N<sub>2</sub> en el tubo de incubación; luego de agregarles Triton X-100 (0.6% de concentración final en la mezcla tipo) y buffer, se agitaron vigorosamente en vortex para resuspenderlos bien. Recién entonces se completó la mezcla de incubación.

Las reacciones se finalizaron añadiendo 0.1 ml de butanol.

La incorporación de marca a material soluble en solventes orgánicos se determinó extrayendo la mezcla 3 veces con 0.1 ml de butanol, luego estos extractos combinados se lavaron 3 veces con 0.1 ml de agua (68). Finalmente se tomaron alícuotas de las fracciones butanólica y acuosa para determinar la radioactividad.

Rutiniariamente el material soluble en butanol se cromatografió en papel en los solventes E y F. El solvente F permite distinguir lípido-fosfato-azúcares, que migran cerca del frente de: nucleótido-azúcares, hexosas y sus ésteres fosfóricos de movilidad menor, que podrían contaminar el extracto.

El solvente E, en cambio, distingue entre Lípido-P-Gal, Lípido-PP-Glu y Lípido-PP-Celobiosa. El Lípido-P-Gal, migra cerca del frente del solvente ( $R_f=0.9$ ) (68), el Lípido-PP-Glu y el Lípido-PP-Cel, se descomponen produciendo los ésteres cíclicos de los correspondientes azúcares, de movilidades características:

$R_f=0.57$  para el éster proveniente del Lípido-PP-Glu y

$R_f=0.43$  para el éster proveniente del Lípido-PP-Cel (68).

La incorporación de radioactividad a polisacárido se determinó tratando el material insoluble en butanol 3 veces con 0.050 ml de una solución agua-metanol 5:1. El precipitado se descartó y el sobrenadante se cromatografió en el solvente G para separar sustancias de alto peso molecular, que quedan en el origen del cromatograma, del exceso de sustrato radioactivo, de movilidad mayor. La zona del origen de cada uno de los cromatogramas se cortó para medir su radioactividad.

Incubación para determinar actividad de prenil quinasa. — Se llevó a cabo en dos etapas. Se utilizó la mezcla de incubación tipo, en la que el nucleótido-azúcar fué reemplazado por  $AT^{32}P$ , con el agregado o no de ficaprenol y Triton X-100 (0.1% de concentración final). Se incubó primero 15 minutos a  $30^{\circ}C$  y luego se añadió un exceso de UDP-Gal no radioactivo continuandose la incubación por espacio de 90 minutos más.

Las reacciones también se finalizaron añadiendo 0.100 ml de butanol procediendose luego en la forma indicada.

El detergente añadido para solubilizar al ficaprenol resultó un buen inhibidor de las ATP-asas presentes en la preparación enzimática, de tal forma que durante la primera incubación se degradó menos de un 25% del  $AT^{32}P$ , a juzgar por su adsorción sobre carbón activado.



b) Con enzima de arvejas.— Las incubaciones se efectuaron a 20°C durante 30 minutos. La mezcla contenía:

$\beta$ -Mercaptoetanol	0.5 $\mu$ moles
Buffer 0.1M Tris-HCl pH 7.4	2.5 $\mu$ moles
MgCl <sub>2</sub>	0.2 $\mu$ moles
UDP-( <sup>14</sup> C)Glu	0.8-1.0 nmoles
Enzima	100-300 $\mu$ g proteína

El volumen final se ajustó a 0.050 ml con agua.

Cuando se usó un aceptor lipídico exógeno se procedió como en el sistema de *Acetobacter xylinum*, añadiendo Triton X-100 (0.5% de concentración final) a la mezcla de incubación.

La reacción se detuvo con butanol y se procedió en la forma ya indicada.

Esta preparación incorpora glucosa a lípidos neutros además de a los polares y por lo tanto se debieron separar ambos. Se usó cromatografía en papel de DEAE-celulosa (Whatman DE-20) con butanol saturado en agua como solvente. Con este sistema los lípidos polares cargados negativamente quedan en el origen, mientras que los lípidos neutros o cargados positivamente migran con el frente del solvente. Luego de ubicar la radioactividad en un radiocromatógrafo, se cortaron el origen y el frente de cada corrida y se midió su radioactividad.

En otros casos los lípidos neutros se separaron de los cargados por cromatografía en columnas de DEAE-celulosa chicas.

### Tratamientos degradativos

Hidrólisis a pH 2 de lípido-azúcares. - Se realizó de 2 maneras:

- a) A las muestras llevadas a seco bajo  $N_2$ , se les agregó HCl 0.01M, se agitaron y calentaron a  $100^\circ C$  10 minutos. El HCl se eliminó evaporando a sequedad 3 veces añadiendo 0.050 ml de agua cada vez.
- b) A las muestras, en butanol, se les agregó un volumen de metanol, cuatro volúmenes de agua y ácido hasta una concentración final de 0.01M. Se obtuvo así una sola fase. Este procedimiento evita la ruptura que experimentan algunos compuestos cuando se los lleva a seco (68). Luego se calentó a  $100^\circ C$ , 10 minutos, se enfrió y añadió butanol para separar las fases orgánica y acuosa. El butanol se lavó dos veces con agua, y este lavado se unió a la fase acuosa. Finalmente se contaron alícuotas de ambas fases.

Otras condiciones de hidrólisis ácida sobre distintos compuestos se indican en cada caso.

Hidrólisis de polisacáridos. - Se utilizó el método de Davison (180) para hidrolizar polisacáridos capsulares. A la muestra se agregó resina Dowex 50 X 6 ( $H^+$ ) en presencia de HCl 0.1M y se calentó a  $100^\circ C$  de 24 a 72 horas, en tubos cerrados a la llama. La resina se separó luego por centrifugación y el sobrenadante se llevó a seco varias veces tomando con agua para eliminar el exceso de HCl.



Tratamiento alcalino de aceptores lipídicos. - Se siguió el método de Dawson (181) tal cual lo describen Labav y col (22). La muestra se trató con NaOH 0.1M en cloroformo-metanol 1:4, 15 minutos a 37°C, se neutralizó y separó la fase acuosa de la clorofórmica, la que se lavó 3 veces con una mezcla agua-metanol 2:1. La capacidad aceptora se midió en la fase clorofórmica.

Reducción catalítica. - Se hizo en la forma descrita por Wright y col (20) con ligeras modificaciones. El Pt se preparó a partir de una solución acuosa de hexacloroplatinato de amonio y exceso de  $\text{NaBH}_4$ . El precipitado de Pt metálico se lavó con agua y con butanol saturado en agua.

La muestra disuelta en butanol se añadió sobre el Pt, se agitó para resuspenderlo y se burbujeó  $\text{H}_2$  por espacio de 4 horas con intensidad suficiente como para mantener el Pt en suspensión. Se centrifugó, quitó el butanol y el Pt se lavó sucesivamente con butanol y con agua. Las fracciones butanólicas se combinaron y lavaron con agua y todas las fases acuosas se reunieron.

Finalmente se contaron alícuotas de ambas fases.

Tratamiento con fenol. - Este tratamiento se efectuó tal como lo describen García y col (68). En general las muestras se llevaron a seco, se les agregó 0.160 ml de fenol al 50% y se trataron a 68-70°C durante los tiempos indicados en cada caso. Se enfriaron y centrifugaron para separar las fases acuosa y fenólica. La fase fenólica se lavó 3 veces con 0.060 ml de agua. Estos lavados acuosos se combinaron con la fase acuosa y se lavaron 3 veces con éter etílico para

para eliminar el fenol. La fase fenólica se llevó a seco agregando éter etílico varias veces y evaporando con corriente de  $N_2$  cada vez. Se contaron alícuotas de ambas fases.

#### Tratamientos enzimáticos.

Fosfatasa alcalina (E. coli de Sigma).— Las incubaciones se hicieron en buffer 0.1M Tris-HCl pH 8.2, a 30°C durante 60 minutos.

La mezcla de incubación se sometió directamente a electroforesis (en acetato de piridinio pH 6.5).

$\alpha$ -amilasa.— Se obtuvo una preparación cruda de  $\alpha$ -amilasa salivar (primer sobrenadante) en la forma descrita por Bernfeld (182). Se incubó con buffer 1M Tris-HCl pH 7.8 en atmósfera de tolueno a 37°C durante 20 horas (183). La reacción se detuvo con 2 volúmenes de etanol y la mezcla se cromatografió directamente en papel con el solvente H.

$\beta$ -fosfoglucomutasa.— (Parcialmente purificada de Euglena gracilis y cedida gentilmente por el Dr. L. Maréchal). Las incubaciones se efectuaron a 37°C durante 60 minutos en la forma descrita por Belocopitow y col (184). La mezcla de incubación contenía: buffer 0.04M HEPES pH 7.0, 0.005M  $MgCl_2$ , 0.0008M EDTA, 0.1M arseniato de sodio pH 7.0, 0.010 ml de enzima y los sustratos radioactivos o no. La reacción se detuvo añadiendo 0.020 ml de HCl 1M y calentando a 100°C 10 minutos. El hidrolizado resultante se analizó directamente por electroforesis en acetato de piridinio para separar glucosa de glucosa-6-fosfato.

### Cromatografía en columnas de DEAE-celulosa

a) DEAE-celulosa (tipo SS p. A, de Serva) para soluciones lipofílicas.— Se siguieron dos técnicas parecidas. En un caso se usaron columnas de 1.2 x 60 cm, refrigeradas y se siguió el método de Rousser y col (185), modificado por Dankert y col (58). La elución se hizo con un gradiente lineal (400 ml) de acetato de amonio de 0 a 0.4M en metanol 99%. Las fracciones colectadas fueron de 3 ml.

En el otro caso se usaron columnas chicas (0.8 x 31 cm), no refrigeradas, las que se lavaron con 12 ml de metanol 99%. Luego se eluyeron en forma discontinua usando concentraciones crecientes de acetato de amonio en metanol 99%: 0.1M (12 ml), 0.2M (12 ml) y 0.4M (36 ml). Se colectaron fracciones de 3 ml.

b) DEAE-celulosa para soluciones acuosas.— En este caso la DEAE tratada con ácido, álcali y lavada se resuspendió directamente en ácido acético 1M y se filtró y lavó para quitar el exceso de ácido.

La columna de 1.2 x 60 cm, se usó sin refrigeración. Se eluyó con un gradiente lineal (800 ml) de 0 a 1M de acetato de amonio en agua y se colectaron fracciones de 6 ml.

### Cromatografía en capa delgada

Se usaron placas de vidrio de 5 x 20 y de 12 x 20 cm. Se lavaron dejándolas una noche con mezcla sulfocrómica o detergente y, luego de enjuagarlas con bastante agua común y agua destilada se



secaron en estufa a 110°C y se dejaron enfriar. Se preparó una mezcla de agua-sílica Gel G (Merck tipo 60) 2:1 (v/p), la que inmediatamente después de homogeneizada se extendió sobre las placas con un extensor Desaga a velocidad constante y con un grosor de 750 u. Luego de aproximadamente 1 hora se activaron a 110°C durante 90 minutos. Se conservaron en desecador.

Ocasionalmente se utilizaron también placas Eastman (Sílica Gel G Eastman chromatogram sheet 6061) cortadas en tiras de 2 x 14.5 cm.

Solventes usados:

- A: Eter isopropílico-éter de petróleo (PE 30-65) 1:4 (v/v) (45)
- B: 1% Metanol en benceno (v/v) (45)
- C: Disobutilcetona-ácido acético-agua 20:15:2 (v/v) (186)
- D: Isopropanol-amoniaco-agua 6:3:1 (v/v) (187)

Para cromatografía en fase invertida se procedió en forma análoga pero se utilizó sílica Gel H (Merck) y el espesor fué de 200 u. Una vez activadas y frías las placas se impregnaron con una solución al 5% de parafina líquida en éter de petróleo (PE 30-65) y se dejaron secar. El solvente usado en este caso fué acetona-agua 23:2 (v/v) (45).

En los casos en que interesaba recuperar alguno de los compuestos cromatografiados, las placas de sílica Gel G fueron previamente lavadas dejándoles correr HCl (concentrado)-metanol 1:9 (v/v) (188). Luego se secó y activó en la forma antes indicada. Siguiendo esta técnica y desarrollando en solvente C el ficaprenil fosfato puede ser eluido en forma más eficiente. Para ello la placa se dividió en

en bandas de 1cm y se raspó el material para recibirlo en un tubo que contenía 1 ml de una mezcla de cloroformo-metanol 3:2 y 0.050 ml de HCl concentrado. Se agitó y centrifugó para quitar el sobrenadante y el precipitado se reextrajo en la misma forma. Se reunieron las fases orgánicas (aproximadamente 2 ml por banda eluida) y se lavaron con 0.4 ml de  $MgCl_2$  4mM. La fase superior se descartó y la inferior se lavó según el método de Folch y col (189) hasta pH 6-7 (se usó para ello cloroformo-metanol- $MgCl_2$  4mM 3:48:47). Las fracciones así lavadas se concentraron primero bajo  $N_2$  y luego con presión reducida hasta sequedad. Se retomaron en cloroformo-metanol 2:1 y se volvieron a llevar a seco. La operación se repitió hasta eliminar la diisobutilcetona. Finalmente se tomaron en cloroformo-metanol 2:1. Con sustancias radioactivas se procedió en idéntica forma pero en lugar de eluir la placa cm por cm se trabajó solo con las zonas radioactivas.

Los poliprenoles se detectaron con una mezcla de anisaldehído-etanol-ácido sulfúrico 1:18:1 (v/v) (46); luego de calentar 5 minutos a 100°C en estufa apareció el color verde característico, aunque a veces varió del gris al violeta. Cuando en lugar de estufa se calentó con corriente de aire caliente el color fué siempre verde.

Los poliprenoles se revelaron también con fluoresceína al 0.01% en etanol (190). Se pasó la placa por vapor de agua y se colocó bajo una lámpara UV: se los vió de un color rosado-violáceo sobre un fondo ligeramente fluorescente. Esta técnica se usó cuando no se quiso dañar los poliprenoles a fin de poder eluir las zonas respectivas.



### Cromatografía y electroforesis en papel

Salvo indicación expresa solo se utilizó papel Whatman N°1.

#### Solventes usados:

- E: Amoníaco 3M en etanol 80% (v/v) (191)
- F: Isopropanol-ácido acético-agua (27:4:9) (v/v) (192)
- G: Etanol-ácido acético-acetato de amonio 1M  
(75:26:4) (v/v) (191)
- H: Butanol-piridina-agua (6:4:3) (v/v) (193)
- I: Acido isobutírico-amoníaco 1M (20:1) (v/v)
- J: Isopropanol-agua (4:1) (v/v)
- K: Butanol-piridina-buffer borato de piperidinio  
pH 10.5 (6:4:3) (194)
- La concentración de ambos componentes en el buffer fue  
de 0.35M (194)
- L: Eter de petróleo (PE 30-65).

Para el solvente E se usó la técnica ascendente y para los solventes L y J se usó tanto el sistema ascendente como el descendente.

Para el solvente K se usó el papel cortado según Matthias (195), mojado previamente en el buffer borato de piperidinio, pH 10.5 a una concentración 0.0175M. Para obtener buenas resoluciones se observó que la temperatura debía ser superior a los 25°C.

El solvente I es una modificación del solvente ácido isobutírico-amoníaco 1M (5:3) (161, 196). En este último el Pi tiene un  $R_f$  aproximado de 0.2-0.3 pero en el solvente I el Pi queda en el origen, lo cual ofreció ventajas para separarlo del prenil-fosfato.

especialmente cuando los cromatogramas se desarrollaron en forma ascendente, en tiras de papel de 2 x 15.5 cm para resolución rápida (aproximadamente 1-2 horas).

Para ubicar los azúcares reductores se utilizó el nitrato de plata alcalino (197). A los compuestos con fósforo se los ubicó con el reactivo de molibdato (198). Los prenoles se revelaron con la mezcla anisaldehído-ácido sulfúrico, obteniéndose un color rosa luego de calentar con corriente de aire.

La electroforesis se efectuó tal como lo señalan García y col (68). Normalmente se aplicaron 1000 Volts (20 Volts/cm) durante 150-180 minutos. Salvo indicación expresa el buffer utilizado fué 1.2M acetato de piridinio pH 6.5.

#### Métodos analíticos

Los azúcares se dosaron en general con el método del fenol-sulfúrico (199), usando como patrón glucosa.

La ramnosa se determinó por el método de Dische y col (200) tal como lo describe Spiro (201) usando ramnosa (Merck) como patrón.

Las proteínas se determinaron por el método de Lowry (202) y el patrón usado fué albúmina de suero bovino.

Para la determinación de fosfatos se usaron 2 métodos:

a) El de Chen y col (203) y

b) Una modificación del método de Hers y Derr (204) hecha en colaboración con E. Tábor. En este último caso se procedió así:

Fósforo inorgánico.- A 0.35 ml de muestra en agua se agregaron 0.050 ml de ácido sulfúrico 5N y 0.050 ml de molibdato de

amonio al 2.5% en agua, se agitó y añadió 0.010 ml de Tween 20 al 1.5%, se agitó y luego se agregaron 0.050 ml de verde de malaquita al 0.1%. Se dejó 30 minutos a temperatura ambiente y leyó a 660 nm en un espectrofotómetro Gilford. Con 0.1 nmoles de Pi la absorbancia fue de 0.11-0.12, es decir, la sensibilidad resultó ser 5 veces mayor que con el método de Chen y col. La curva patrón se realizó con una solución de Pi 0.1mM en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.05N. En todos los casos los tubos en que se hizo la determinación fueron previamente calentados 30 minutos a 100°C, con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  50% y luego se lavaron 3 veces con agua destilada. Las celdas del espectrofotómetro se dejaron una noche con mezcla sulfocrómica, se enjuagaron con agua destilada y se secaron sobre papel de filtro.

Determinación de fósforo total.- A las muestras llevadas a seco se agregaron 0.020 ml de  $\text{HClO}_4$  70% y 0.050 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5N y se calentó a la llama hasta eliminar el  $\text{HClO}_4$  (vapores blancos). Luego se añadieron 0.250 ml de agua y se calentó a 100°C 10 minutos. Finalmente se dosó fosfato por el método b.

#### Productos químicos

Todos eran productos comerciales, con las siguientes excepciones:

El dolicol, dolicol fosfato natural y fosforilado químicamente fueron gentileza de los doctores N. Behrens y E. Tábora.

El 1,6 anhidrogalactosano y 1,6 anhidroglucosano fueron preparados por el método de Montgomery y col (205) tal cual lo



describen García y col (68) a partir de 0-nitrofenil  $\beta$ -D-galactopiranosido y salicina, respectivamente.

El ácido manurónico se preparó a partir de ácido algínico siguiendo la técnica de Whistler y col (206).

El ficaprenol se obtuvo por el método de Stone y col (45) con algunas modificaciones.- En una experiencia tipo se pesaron 500 gramos de hojas de gomero, Ficus elástica, previamente desnervadas, se trozaron y extrajeron con 900 ml de acetona durante 2 minutos en una licuadora metálica (Waring commercial blender).

A la mezcla resultante se le agregaron 300 ml de éter etílico y se dejó extrayendo con agitación ocasional durante 2-3 horas; luego se filtró por tela para quesos y el precipitado se trató con 1000 ml de éter de petróleo (PE 30-65). A continuación los extractos orgánicos se pasaron a un embudo de decantación y se les hizo una partición añadiendo 1/6 de volumen de agua; luego la fase orgánica se lavó con 1/4 de volumen de agua hasta que dicha fase quedó incolora (4-6 veces).

La fase orgánica lavada se secó luego durante 24-48 horas con sulfato de sodio anhidro, se filtró, llevó a seco, pesó y retomó en 50 ml de éter etílico al 2% en éter de petróleo (PE 30-65). En este estado se conserva bien en congeladora a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Porciones de aproximadamente 1 grano de dicho material se fraccionaron por cromatografía en una columna de alúmina (Bröckman actividad II de Serva) con una relación alúmina-sustancia de 50:1, en peso. Para preparar la columna, la alúmina se resuspendió bien en éter etílico al 2% en éter de petróleo (PE 30-65) y se empacó cuidando



agregar todo el material de una vez para evitar fracturas.

La columna usada fué de 1.2 x 60 cm, no refrigerada, y la muestra (5 ml) se eluyó sucesivamente con los solventes que se indican:

2% Éter etílico en éter de petróleo (PE 30-65) (v/v)	400 ml
10% Éter etílico en éter de petróleo (PE 30-65) (v/v)	1000 ml
50% Éter etílico en éter de petróleo (PE 30-65) (v/v)	100 ml
75% Éter etílico en éter de petróleo (PE 30-65) (v/v)	500 ml
100% Éter etílico	500 ml

El desarrollo de la columna se siguió por cromatografía en capa delgada en el solvente A.

El ficaprenol se eluyó con el solvente que contenía 10% éter etílico en éter de petróleo (PE 30-65). Se obtuvieron 3 fracciones:

- a) Ficaprenol más contaminantes de mayor  $R_f$  (aproximadamente 25%).
- b) Ficaprenol puro (aproximadamente 50%).
- c) Ficaprenol más contaminantes de  $R_f$  menor (aproximadamente 25%).

Los tubos que contenían ficaprenol y contaminantes se purificaron por cromatografía, en capa delgada, en bandas, con el solvente A, usando como revelador fluoresceína. Para su elución, en este caso, una vez ubicada la banda de ficaprenol se raspó la placa en ese lugar y la sílica se dejó caer sobre éter etílico. Se agitó, quitó el éter y se volvió a extraer en la misma forma. A

partir de 500 gramos de hojas se obtuvieron 0.200 gramos de prenol.

La pureza del material se estableció por los espectros infrarrojo y de resonancia magnética nuclear. El análisis por espectrografía de masas indicó que se trataba de una mezcla aproximadamente equimolecular de undecaprenol y dodecaprenol. Similares resultados se obtuvieron por cromatografía en fase invertida con el solvente acetona-agua 23:2 (v/v), aunque en este caso se observó también la presencia de decaprenol.

Fosforilación química del prenol.— Se siguió la técnica de Cramer (207) descrita por Popják (208) y modificada por Belhrens y Leloir (30).

Se usó como agente fosforilante el fosfato de dietilamina (PDTEA). Se disolvieron 2 gramos de  $H_3PO_4$  99% en 100 ml de acetonitrilo destilado y se le agregaron 41.3 gramos de trietilamina. Se dejó una noche en desecador a temperatura ambiente para que cristalizara. Los cristales se separaron de la solución madre, se secaron y parte de ellos se usó para preparar la solución fosforilante (0.1M PDTEA en acetonitrilo). El rendimiento de esta preparación fue de un 60% del fosfato inicial.

Fosforilación.— A 10  $\mu$ moles de ficaprenol disueltos en 3 ml de benceno se le agregaron 0.2 ml de tricloroacetoneitrilo ( $CCl_3CN$ ), se dejó en reposo 15 minutos en desecador y luego se añadió gota a gota y con agitación 15 ml de la solución fosforilante (1.5  $\mu$ moles de PDTEA). Pasadas 2 horas se repitieron los agregados a la solución de ficaprenol (3  $\mu$ moles de PDTEA en total). Se dejó

durante la noche, y al día siguiente se llevó a seco a presión reducida en un evaporador rotatorio; se retomó en una mezcla compuesta de 0.1 ml de  $\text{MgCl}_2$  4mM, 1.6 ml de metanol y 2.4 ml de cloroformo con el objeto de obtener 2 fases. Luego de agitar y centrifugar se descartó la fase superior y la fase inferior amarilla se lavó de 10 a 15 veces con una mezcla de cloroformo-metanol- $\text{MgCl}_2$  4mM (3:48:47) (llamada fase superior teórica de Folch) (189). Finalmente la fase inferior se llevó a seco y retomó en 0.6 ml de cloroformo-metanol 2:1.

La pureza del producto obtenido se verificó rutinariamente sembrando 0.005 ml de muestra en tiras de papel Whatman N° 1 (de 2 x 15.5 cm). El cromatograma se desarrolló en el solvente I, el ficaprenil-fosfato (FMP) y el exceso de  $\text{P}_i$  se revelaron con el reactivo de Burrows (198).

El prenol que no se fosforiló se separó del producto por cromatografía en tiras de papel, de 2 x 15.5 cm, en el solvente L. En este sistema el ficaprenol fosforilado (FMP) queda en el origen y el prenol libre migra con el frente. Se cortaron los orígenes y frentes y se eluyeron de la siguiente forma: se colocaron los trozos de papel dentro de jeringas hipodérmicas de plástico de 5 ml y sobre ellos se agregaron trozos de papel Whatman N° 1. Se comprimieron fuertemente y se hizo pasar en forma lenta cloroformo-metanol 2:1.

En algunos casos la separación se hizo en columnas de DEAE-celulosa chicas. Este método es más aconsejable. El rendimiento en FMP fue de un 11% con respecto al ficaprenol inicial, y no mejoró



por el hecho de usar solventes destilados y secos, o variando la cantidad de agente fosforilante. Usando 1.5 mmoles de PDTEA el rendimiento fue del 9% y con 6.0 mmoles el rendimiento fue de un 6%.

Cada partida de FMP, se hidrolizó a pH2 y el producto soluble en agua se sometió a electroforesis en acetato de piridinio y a cromatografía en papel en los solventes G e I. En todos los casos el producto de hidrólisis se comportó como Pi.

Obtención de extractos lipídicos de A. xylinum. - Se utilizaron ambas cepas, B42 y 8747. Las células tratadas con EDTA (68) se centrifugaron y el precipitado se extrajo en forma indistinta: a) Con butanol, o b) con cloroformo-metanol.

a) Con butanol se extrajo 4 veces y se agitó ocasionalmente en vortex. El butanol se lavó 3 veces con agua, concentró a presión reducida, retomó en cloroformo-metanol (2:1) y luego se fraccionó por cromatografía en una columna chica de DEAE-celulosa. El dosaje de aceptor en los eluidos de la columna se hizo enzimáticamente utilizando la enzima  $P_{30}$ .

Los eluidos se agruparon en 4 fracciones (FI, II, III y IV) se llevaron a seco, y salvo el percolado se disolvieron en butanol-agua. Las fases butanólicas se lavaron varias veces con agua para eliminar las sales. Se llevaron a seco y todas las fracciones se tomaron en cloroformo-metanol 2:1 (0.6-1.0 ml). Para el dosaje se utilizó de 1/100 a 1/25 de cada fracción.

b) Con cloroformo-metanol (2:1) se extrajo una vez, se filtró y reextrajo con dicha mezcla, adicionada de amoníaco al 1% (209).



Los extractos combinados se lavaron segun Folch (189), se concentraron a presión reducida y se fraccionaron y dosaron como en el caso anterior.

Preparación de las muestras de aceptor endógeno para espectrografía de masas. El material a analizar se preparó de 2 formas:

1) La fracción con capacidad aceptora eluida de la columna de DEAE-celulosa se hidrolizó en condiciones ácidas suaves (pH2, 100°C, 10 minutos) y se extrajo con éter de petróleo (PE 30-65). Sobre este material etéreo se efectuó el espectro de masa.

2) La fracción soluble en éter de petróleo obtenida como se indicó en 1) se cromatografió en una columna de DEAE-celulosa y se analizó la porción neutra.

La cantidad de muestra analizada, suponiendo que la hidrólisis fué completa, varió entre 30 y 60 ug. (En este caso el dosaje del aceptor se efectuó también enzimáticamente pero incubando durante 2 horas con cantidades saturantes de UDP-(<sup>14</sup>C)-Gal).

Obtención de extractos lipídicos de arveja.— El preparado enzimático de arvejas (página 36 ), se extrajo 3 veces con butanol y se continuó según el procedimiento indicado en a) para *Acetobacter xylinum*, con la salvedad que la determinación de aceptor en los eluidos de la columna se hizo utilizando enzima de arveja.

Los extractos lipídicos de insecto y soja fueron gentiles donaciones de los doctores L. Quesada Allué y C. Brett respectivamente.

Obtención de polisacáridos (210).— Se usó el sobrenadante de la obtención de células de *A. xylinum* B42 (página 33). Dicho material se trató de la siguiente manera:

- 1) Se concentró a presión reducida en un evaporador rotatorio a temperatura no mayor de 40°C.
- 2) El jarabe resultante se llevó a pH 2 con  $H_2SO_4$  5N y se descartó el precipitado formado.
- 3) El sobrenadante se llevó a pH 8-9 con NaOH 10N, se descartó el precipitado.
- 4) Al sobrenadante alcalino se le agregó  $H_2SO_4$  5N hasta pH 2 y luego se le añadieron 2 volúmenes de acetona a 4°C, en forma lenta y con agitación.
- 5) Se dejó en heladera por 2 ó más días.
- 6) Se descartó el sobrenadante y el precipitado se retomó en el mínimo de agua y se dializó contra 4 litros de agua durante 24 horas cambiándola 4-5 veces.
- 7) El material dializado se liofilizó y guardó a -20°C hasta su uso.

Partiendo de 6.8 litros de cultivo se obtuvieron 0.95 gramos de polisacáridos.

Precipitación de mananos.— Se hizo según el método de Algranati y col (211), pero usando tanto el reactivo de Somogyi como el de Fehling.

Compuestos radioactivos.— UDP-( $^{14}C$ )-Glu y UDP-( $^{14}C$ )-Gal fueron preparados por N. Iñón de Iaino a partir de glucosa uniformemente marcada (Amersham-Searle, 200-300 mCi/mmol de actividad

específica), siguiendo la técnica descrita por Thomas (212) con diversas adaptaciones.

El ( $\gamma$   $^{32}\text{P}$ ) ATP fué cedido gentilmente por el Dr. R. Piras (=AT $^{32}\text{P}$ ).

El  $^{32}\text{P}$  fué provisto por la Comisión Nacional de Energía Atómica y por Amersham-Searle.

El DoIMP-( $^{14}\text{C}$ )-Glu obtenido con enzima de hígado de rata fué una donación del Dr. C. Brett.

Preparación de ficaprenil monofosfato ( $^{32}\text{P}$ ) (=FM $^{32}\text{P}$ )..- Se siguió la misma técnica descrita para el FMP no radioactivo con algunas modificaciones.

Preparación de agente fosforilante ( $^{32}\text{PDTEA}$ ).- A 20 mCi de  $^{32}\text{Pi}$  sin portador se agregaron 0.1 mmoles de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , se llevaron a seco y se la añadieron 0.050 ml de acetonitrilo y 0.030 ml de trietilamina. Al día siguiente se evaporó el exceso de reactivos y el  $^{32}\text{PDTEA}$  se disolvió en 0.60 ml de acetonitrilo.

Fosforilación.- A 0.4 umoles de prenol disueltos en 0.120 ml de benceno se agregaron 0.010 ml de tricloroacetónitrilo y 60 umoles de  $^{32}\text{PDTEA}$  y se procedió en la forma ya señalada.

Con respecto al  $^{32}\text{Pi}$  inicial, el rendimiento en FM $^{32}\text{P}$ , medido como fosfato ( $^{32}\text{Pi}$ ) ácido lábil, fué de un 0.1%. Dicho material incluye sustancias no identificadas que se separaron por cromatografía en capa delgada (Placas Eastman), en el solvente D. Se obtuvieron varios picos de radioactividad cuyo análisis detallado se describe en Resultados. Solo el pico 3 de  $R_f = 0.7-0.8$  (187)



se comportó como EMP y sirvió como aceptor de galactosa en un ensayo enzimático. Dicho material fué eluido de las placas con 0.1M amoníaco en metanol y su rendimiento osciló entre 0.50 y 0.15% del Pi inicial.

En las fosforilaciones realizadas con pequeñas cantidades de sustancias la humedad fué crítica, y si los materiales y reactivos no fueron previamente secados los rendimientos resultaron aun menores.

Formación del 1,6 anhidrogalactosano y 1,6 anhidroglucosano a partir de derivados radioactivos.— Se siguió la técnica de Montgomery (205) ligeramente modificada (73): Se llevó la muestra a seco bajo  $N_2$  y se trató con 0.1M NaOH en n-propanol al 99%, a 62-68°C durante 90 minutos. Se agregaron 0.1 ml de cloroformo y 0.1 ml de agua, se obtuvieron 2 fases, la inferior (cloroformica) se lavó 3 veces con 0.1 ml de agua, que se reunió a la fase acuosa. Se determinó radioactividad en alícuotas de cada fase, y luego la fase acuosa se neutralizó con resina Dowex 50 x 3 ( $H^+$ ) para su ulterior análisis.

#### Medida de la radioactividad

La radioactividad en electroforogramas y cromatogramas en papel o capa delgada se detectó con un radiocromatógrafo Packard modelo 7201.

Los compuestos radioactivos se midieron con soluciones de Bray (213) o con una mezcla que contenía 4 gramos de Omnifluor (New England Nuclear) en 1 litro de tolueno en contadores de



centelleo Packard Tri-carb modelos 2002 y 2003.

La mezcla de Omnifluor en tolueno se utilizó para contar  $^{32}\text{P}$  y  $^{14}\text{C}$  en trozos de papel provenientes de cromatografías y/o electroforesis. Luego de contado cada papel se lavó 3 veces con tolueno para quitar el exceso de material de centelleo y 3 veces con éter etílico para eliminar el tolueno y poder así eluir las sustancias medidas.

RESULTADOSIncorporación a partir de UDP-Glu

Uno de los primeros problemas encarados fué el de lograr un sistema enzimático y condiciones de incubación que, por el agregado de FMP, permitieran observar un estímulo en la incorporación de hexosa radioactiva (proveniente de UDP-( $^{14}\text{C}$ )-Glu) a material liposoluble.

La Tabla 5 muestra los resultados obtenidos con varios preparados.

Tabla 5. Incorporación de ( $^{14}\text{C}$ ) hexosa a material soluble en butanol con diferentes preparados enzimáticos.

Condiciones de incubación	Células tratadas con lisozima	Células tratadas con tolueno	Particulado de celda de French		Células tratadas con EDTA
			P <sub>48</sub>	P <sub>18</sub>	
	( $^{14}\text{C}$ )-hexosa(pmoles)	( $^{14}\text{C}$ )-hexosa(pmoles)	(pmoles/mg proteína)		
Sin adiciones	2.4	1.4	-	-	2.0
+Triton X-100	18.3	7.3	6.7	19.1	6.2
+F	-	1.5	-	-	1.7
+FMP	-	1.6	-	-	2.2
+Triton X-100 y F	-	7.0	-	-	5.3
Triton X-100 y FMP	28.9	13.3	18.0	29.4	18.5

Las condiciones fueron las de la incubación tipo: 0.65 nmoles de UDP-( $^{14}\text{C}$ )-Glu (309 uCi/umol) y donde se indica 0.6% de Triton X-100, 4.3 nmoles de F (ficaprenol) y 4.5 nmoles de FMP. La fuente enzimática fué la señalada en cada caso.

Como puede verse, en general, el agregado de detergente solo, Triton X-100 en este caso, produce un estímulo considerable (de hasta 7 veces en algunas ocasiones). En ausencia de detergente, en cambio, ni el ficaprenol ni el FMP produjeron variaciones significativas. Por otra parte, el estímulo fué máximo por el agregado de FMP y Triton X-100, en todos los casos.

Tabla 6. Incorporación de ( $^{14}$ C) hexosa a material soluble en butanol, con las diferentes fracciones obtenidas con el desintegrador de Nossal.

Fracción enzimática	Condiciones de incubación	( $^{14}$ C) hexosa (pmoles/mg proteína)
S <sub>48</sub>	sin adiciones	6.4
S <sub>48</sub>	+Triton X-100	40.5
S <sub>48</sub>	+Triton X-100 y FMP	105.0
P <sub>30</sub>	sin adiciones	56.0
P <sub>30</sub>	+Triton X-100	60.8
P <sub>30</sub>	+Triton X-100 y FMP	148.0
S <sub>30</sub>	sin adiciones	1.8
S <sub>30</sub>	+Triton X-100	14.1
S <sub>30</sub>	+Triton X-100 y FMP	37.6
P <sub>30</sub> + S <sub>30</sub>	sin adiciones	4.8
P <sub>30</sub> + S <sub>30</sub>	+Triton X-100	30.1
P <sub>30</sub> + S <sub>30</sub>	+Triton X-100 y FMP	130.0

Las condiciones fueron las indicadas en la incubación tipo: 0.68 nmoles de UDP-( $^{14}$ C)-Glu (309 uCi/umol) y, donde se indica, 0.6% de Triton X-100, 2.5 nmoles de FMP. Enzimas: S<sub>48</sub> (230 ug proteína), P<sub>30</sub> (26.5 ug proteína), S<sub>30</sub> (205 ug proteína) y P<sub>30</sub> + S<sub>30</sub> (26.5 + 205 = 231.5 ug proteína).

Resultados aún más netos se obtuvieron con fragmentos celulares obtenidos con el desintegrador de Nossal (Tabla 6). Como se observa, de las 3 fracciones enzimáticas analizadas la P<sub>30</sub> fué la que produjo las mayores incorporaciones y minimizó a la vez el efecto del detergente. Este efecto fué muy notable en el particulado crudo (S<sub>48</sub>). La recombinación de las fracciones P<sub>30</sub> y S<sub>30</sub> reprodujo practicamente los resultados obtenidos con la S<sub>48</sub>.

La Tabla 7 muestra un experimento realizado solamente con la fracción P<sub>30</sub>. Se reproducen los resultados vistos, y además se

Tabla 7. Efecto de distintas adiciones sobre el sistema P<sub>30</sub>

Condiciones de incubación	( <sup>14</sup> C) hexosa liposoluble (pmoles / mg proteína)
Sin adiciones	51.1
+Triton X-100	73.5
+F	51.4
+FMP	59.9
+F y Triton X-100	64.3
+FMP y Triton X-100	152.4

La incubación tipo contenía: 0.65 nmoles de UDP-(<sup>14</sup>C)-Glu (268) uCi/umol y donde se indica 4.5 nmoles de FMP, 4.3 nmoles de ficaprenol (F) y 0.6% de Triton X-100.

observa que el FMP solo y el ficaprenol solo o en presencia de Triton X-100, no tienen efecto alguno. Nuevamente el estímulo es máximo



(aproximadamente 100% con respecto al incubado con Triton X-100) en presencia de FMP y Triton X-100, que, por otra parte resultó el mejor de los detergentes ensayados (Tabla 8).

Tabla 8. Efecto de diferentes detergentes en presencia o no de FMP, sobre la incorporación de ( $^{14}\text{C}$ ) hexosa a lípidos.

Condiciones de incubación	( $^{14}\text{C}$ ) hexosa liposoluble (pmoles / mg proteína)
Sin adiciones	53.9
+Triton X-100	61.8
+Zonyl A	44.1
+desoxicolato de sodio	31.5
+Triton X-100 y FMP	109.4
+Zonyl A y FMP	42.7
+desoxicolato de sodio y FMP	42.3

Las condiciones fueron las de la incubación tipo con 0.6 nmoles de UDP-( $^{14}\text{C}$ )-Glu (268 uCi/umol), enzima  $\text{P}_{30}$  (92 ug proteína) y donde se indica: 1.8 nmoles de FMP, 0.6% de Triton X-100, 0.09% de Zonyl A y 0.42% de desoxicolato de sodio.

Se investigó también el efecto de fosfolípidos, cefalina en este caso (Tabla 9), pero en los sistemas ensayados no se observaron estimulaciones significativas a menos que el FMP y el Triton X-100 se encuentren presentes.

Tabla 9. Efecto de cefalina sobre la incorporación de ( $^{14}\text{C}$ ) hexosa a material liposoluble.

Condiciones de incubación	Células tratadas con lisozima	Enzima $\text{P}_{30}$
	( $^{14}\text{C}$ ) hexosa	( $^{14}\text{C}$ ) hexosa
	(pmoles)	(pmoles/mg proteína)
Sin adiciones	2.4	48.0
+Triton X-100	18.3	47.6
+Cefalina	2.4	43.5
+Triton X-100 y cefalina	13.2	46.6
+Triton X-100 y FMP	28.4	91.5
+Cefalina y FMP	3.6	50.7
+Triton X-100 + cefalina y FMP	28.9	98.3

Condiciones de la incubación tipo con 0.62 nmoles de UDP-( $^{14}\text{C}$ )-Glu (309 uCi/ $\mu\text{mol}$ ) y donde se indica: 1.25 nmoles de FMP, 135  $\mu\text{g}$  de cefalina, 0.6% de Triton X-100. Las enzimas son las señaladas en cada caso.

Con el sistema enzimático y el detergente elegidos ( $\text{P}_{30}$  y Triton X-100 respectivamente) se estudiaron las condiciones óptimas de estimulación. El efecto de cantidades crecientes de FMP se ve en la Figura 12. Usando la mezcla de incubación tipo, con aproximadamente 0.2 nmoles de FMP se alcanzó una meseta.

El efecto de la concentración de UDP-Glu se estudió entonces en presencia de 0.2 nmoles de FMP (Figura 13). En presencia de FMP y Triton X-100 el estímulo fué mayor a mayor concentración de nucleótido-azúcar, sin que en las condiciones del ensayo, se llegara a una meseta. En todos los otros casos, como era de esperarse, no se observó activación significativa.

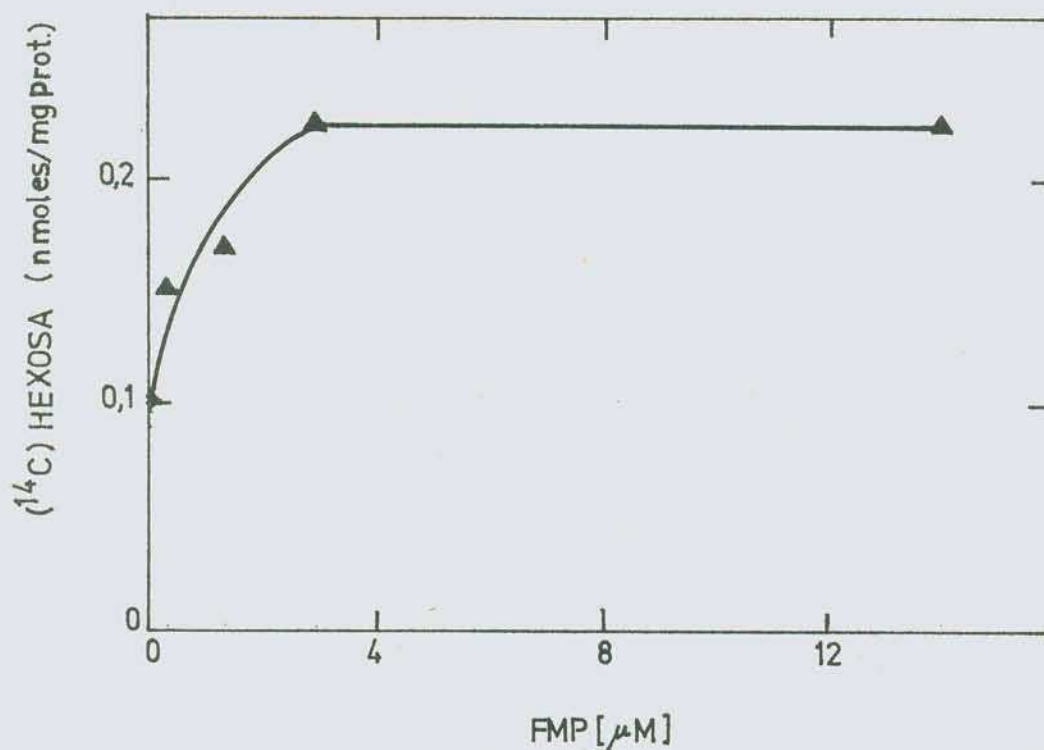


Figura 12. Incorporación de ( $^{14}\text{C}$ ) hexosa a material soluble en butanol en presencia de diferentes cantidades de FMP. Las condiciones fueron las de la incubación tipo con 0.65 nmoles de UDP-( $^{14}\text{C}$ )-Glu (309 uCi/ $\mu\text{mol}$ ), 0.6% de Triton X-100, enzima  $\text{P}_{30}$  (18  $\mu\text{g}$  proteína) y las cantidades de FMP indicadas.

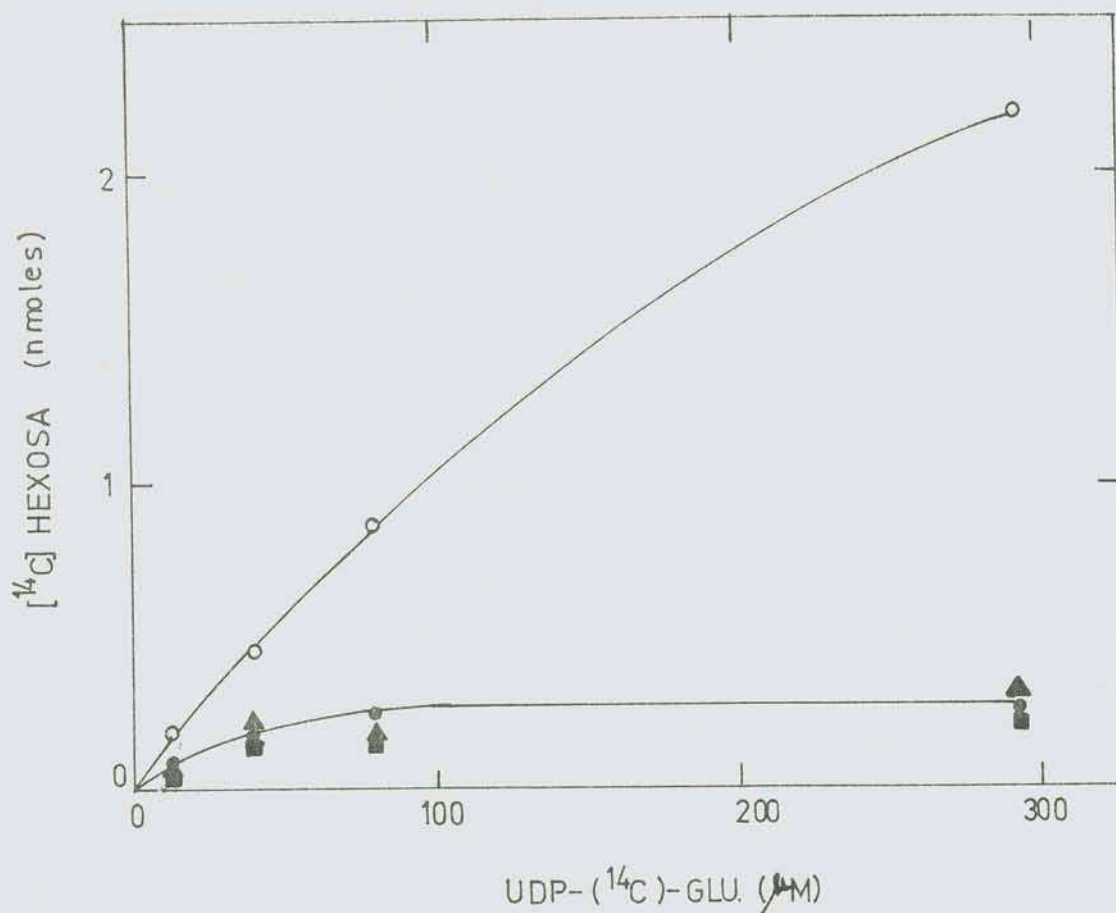


Figura 13: Efecto de la concentración de UDP-(<sup>14</sup>C)Glu. Las condiciones fueron las de la incubación tipo empleando las cantidades de UDP-(<sup>14</sup>C)Glu que se indican y enzima P<sub>30</sub> (25 ug proteína). (○-○) Sin adiciones, (■-■) Triton X-100 0.6% final, (△-△) 1.2 nmoles de ficaprenol y 0.6% de Triton X-100 y (○-○) 0.2 nmoles de FMP y 0.6% de Triton X-100.

#### Análisis de los productos solubles en butanol.

Los extractos butanólicos obtenidos incubando con y sin FMP en presencia de Triton X-100 se analizaron por cromatografía en papel (Figura 14).



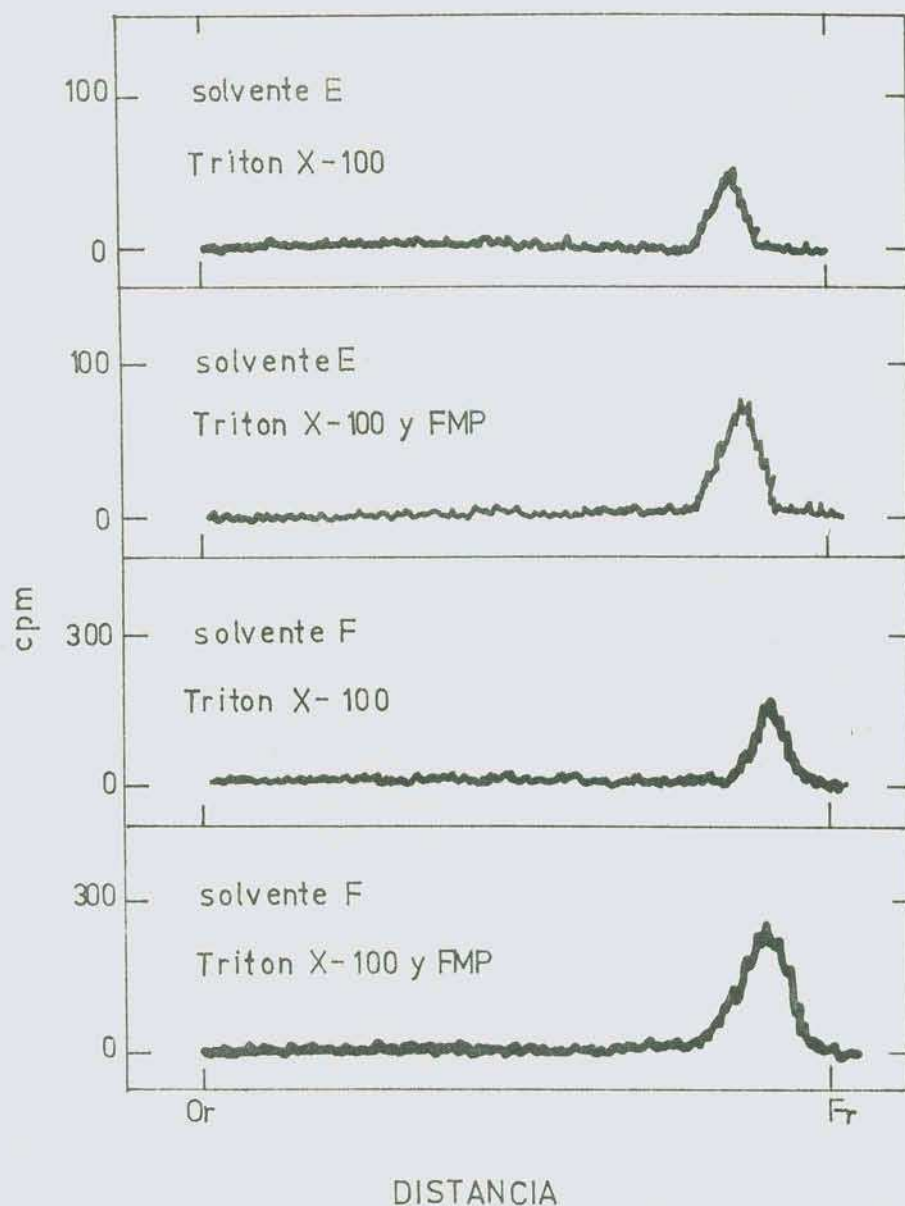


Figura 14: Análisis de los extractos butanólicos por cromatografía en papel. La incubación tipo contenía: 0,6% de Triton X-100, 0,2 nmoles de FMP y 0,6 nmoles de UDP-( $^{14}\text{C}$ )Glu (309 uCi/umol). Se utilizaron los solventes E y F.

Con el solvente F en ambos casos solo se observa radioactividad en el frente, lo que indica la ausencia de contaminantes polares. El solvente E muestra que tanto en presencia como en ausencia de FMP se obtuvo Lípido-P-Gal, y con los dos solventes se observa que en presencia del Lípido-P exógeno hubo un incremento del Lípido-P-Gal.

Por cromatografía en columnas de DEAE-celulosa, de extractos

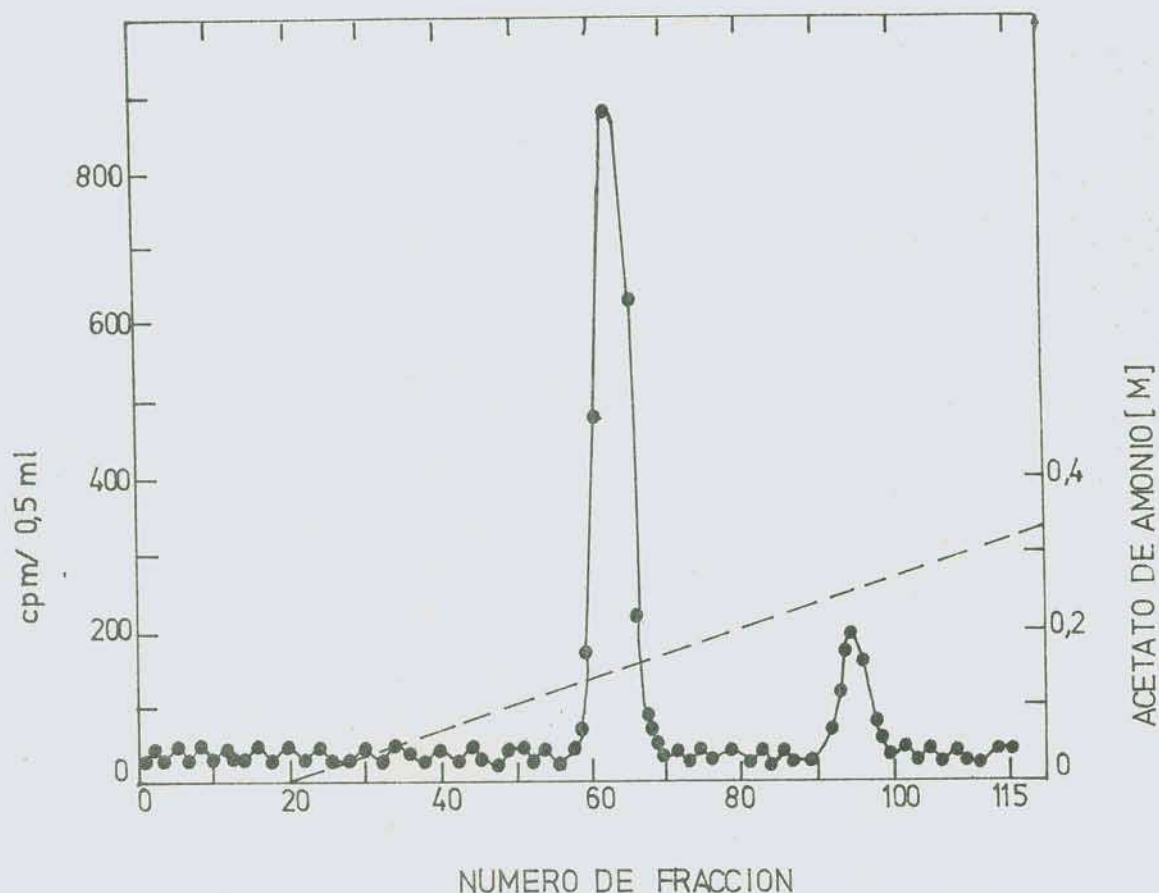


Figura 15: Cromatografía en columna de DEAE-celulosa. El extracto butanólico se obtuvo en una incubación tipo en presencia de 0.2 nmoles de FMP y 0.6% de Triton X-100. Se usó una columna refrigerada de 1.2 x 60 cm desarrollada como se indica en Materiales y Métodos.

butanólicos obtenidos en presencia de FMP y Triton X-100, se obtuvo el perfil que aparece en la Figura 15. En este

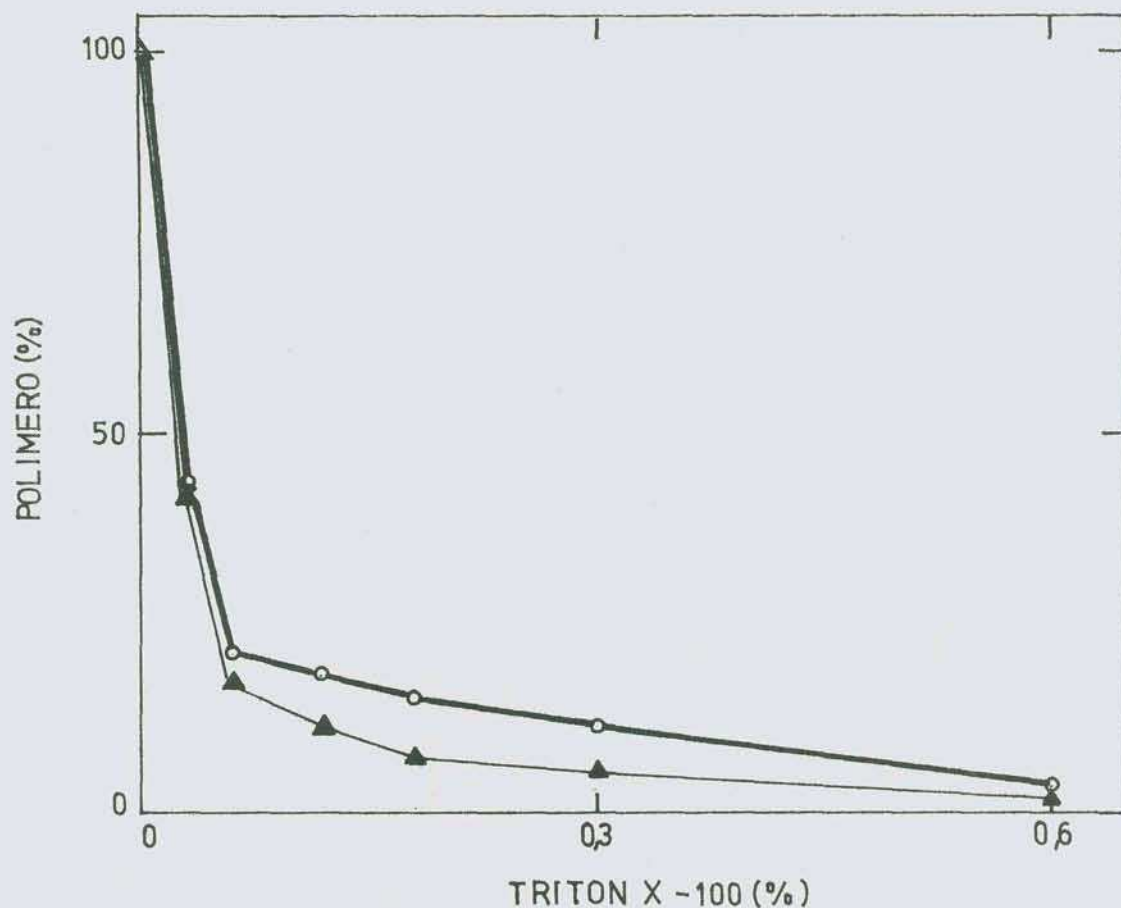


Figura 16. Formación de polímero en presencia de Triton X-100 y de FMP. La incubación tipo contenía: 0.53 nmoles de UDP-(<sup>14</sup>C)-Glu (309 uCi/umol), enzima P<sub>30</sub>, 0.25 nmoles de FMP y las cantidades de Triton X-100 que se señalan. El polímero se midió como se indica en Materiales y Métodos (○—○) Triton X-100, (▲—▲) Triton X-100 y FMP.

caso se observaron dos componentes: uno mayoritario (1) en la posición correspondiente al Lípido-P-Gal y otro menor (2) en la que ocuparía el Lípido-PP-Glu (68). Alícuotas de ambos componentes se hidrolizaron a pH 2 y las fracciones acuosas, que contenían prácticamente toda la radioactividad, se cromatografiaron en el solvente II. Sólo se observó galactosa en el producto del pico 1 y glucosa en el del pico 2.

El análisis de los productos liposolubles indica que en las condiciones de incubación utilizadas solo excepcionalmente se sintetizó Lípido-PP-Glu (Figura 15). Debido a ello se investigó someramente el efecto del Triton X-100 y del FMP sobre la formación de polímero en dichas condiciones. La Figura 16 muestra que la síntesis del glucano se redujo drásticamente en función del incremento de Triton X-100; dicha disminución no fue revertida por la presencia de FMP. Tano Zonyl A (0.09%) como desoxicolato de sodio (0.42%) produjeron el mismo efecto que el Triton X-100 (0.6%).

#### Incorporación a partir de UDP-Gal

El hecho que normalmente el incremento producido por el Lípido-P exógeno se tradujera en una mayor formación de Lípido-P-Gal (Figuras 14 y 15) indujo a estudiar la síntesis del Lípido-P-Gal utilizando directamente UDP-Gal como nucleótido-azúcar dador.

Una experiencia en paralelo utilizando UDP-Glu y UDP-Gal (Tabla 10) muestra que las incorporaciones en presencia de



este último no solo fueron mucho mayores sino que también lo fué el estímulo producido por el FMP.

Tabla 10: Incorporación a material soluble en butanol a partir de UDP-Gal y UDP-Glu.

Condiciones de incubación	UDP-( <sup>14</sup> C)Glu	UDP-( <sup>14</sup> C)Gal
	(14C) Hexosa (pmoles/mg proteína)	
Sin adiciones	50.6	455
+Triton X-100	63.8	734
+Triton X-100 y FMP	113.6	4124

La incubación tipo contenía enzima P<sub>30</sub> (90 ug proteína), y donde se indica 0.6 nmoles de UDP-(<sup>14</sup>C)Glu (268 uCi/umol); 0.62 nmoles de UDP-(<sup>14</sup>C)Gal (154.5 uCi/umol); 1.8 nmoles de FMP y 0.6% de Triton X-100.

Preparado enzimático.

Vistas las mayores incorporaciones obtenidas con UDP-Gal, se probaron, al igual que con UDP-Glu, los preparados enzimáticos ensayados anteriormente. Un resumen de las incorporaciones obtenidas aparece en la Tabla 11. Los resultados son análogos a los obtenidos con UDP-(<sup>14</sup>C)Glu: con las células tratadas con EDTA el detergente estimuló la incorporación a material soluble en butanol, estímulo que fué aun mayor en presencia de FMP. El FMP solo no produjo ningún efecto. El ficaprenol solo o en presencia de Triton X-100 no

aumentó las incorporaciones. Resultados muy similares se obtuvieron con las células tratadas con tolueno, y aunque las células tratadas con lisozima produjeron poco estímulo con el detergente y un buen incremento en presencia de FMP, no se continuaron usando por las dificultades en lograr resultados reproducibles.

Tabla 11: Incorporación de ( $^{14}\text{C}$ ) hexosa a material soluble en butanol con diferentes preparaciones enzimáticas.

Condiciones de incubación	Células tratadas con LDTA	Células tratadas con Tolueno	Células tratadas con lisozima
	( $^{14}\text{C}$ ) hexosa		( $^{14}\text{C}$ ) hexosa
	(pmoles/mg proteína)		(pmoles)
Sin adiciones	5.3	5.8	56.0
+Triton X-100	22.6	18.9	92.9
+F	5.3	-	-
+FMP	6.4	7.0	-
+F y Triton X-100	19.4	-	-
+FMP y Triton X-100	71.9	62.5	496.7

Las condiciones fueron las de incubación tipo, con 0.66 nmoles de UDP-( $^{14}\text{C}$ )Gal (142 uCi/umol) y, donde se indica, 4.3 nmoles de ficaprenol (F), 1.8 nmoles de FMP y 0.6% de Triton X-100.

Las mejores estimulaciones volvieron a lograrse con fragmentos celulares obtenidos con el desintegrador de Nossal (Tabla 12), y la fracción más adecuada fué también la P<sub>30</sub>, ya que minimizó el efecto del detergente e hizo máximo el estímulo por el FMP. Las fracciones P<sub>30</sub> y S<sub>30</sub> combinadas volvieron a reproducir los resultados obtenidos con S<sub>48</sub>.

Tabla 12: Incorporación de (<sup>14</sup>C) hexosa a material soluble en butanol con las diferentes fracciones celulares obtenidas con el desintegrador de Nossal.

Fracción enzimática	Condiciones de incubación	( <sup>14</sup> C) hexosa (pmoles/mg proteína)
S <sub>48</sub>	Sin adiciones	25.3
S <sub>48</sub>	+ Triton X-100	176.4
S <sub>48</sub>	+ Triton X-100 y FMP	912.7
P <sub>30</sub>	Sin adiciones	981.2
P <sub>30</sub>	+ Triton X-100	1383.2
P <sub>30</sub>	+ Triton X-100 y FMP	7895.0
S <sub>30</sub>	Sin adiciones	51.0
S <sub>30</sub>	+ Triton X-100	10.5
S <sub>30</sub>	+ Triton X-100 y FMP	104.2
P <sub>30</sub> + S <sub>30</sub>	Sin adiciones	44.5
P <sub>30</sub> + S <sub>30</sub>	+ Triton X-100	263.9
P <sub>30</sub> + S <sub>30</sub>	+ Triton X-100 y FMP	1218.0

La incubación tipo contenía: 0.62 nmoles de UDP-(<sup>14</sup>C)Gal(154.5 uCi/umol) y donde se indica 2.5 nmoles de FMP y 0.6% de Triton X-100. Enzimas: S<sub>48</sub> (288 ug proteína), P<sub>30</sub> (64.5 ug proteína), S<sub>30</sub> (220 ug proteína) y P<sub>30</sub> + S<sub>30</sub> (64.5 + 220 ug = 284.5 ug proteína).

La fracción  $P_{30}$  fué extraída con butanol, con la esperanza de obtener mejores estimulaciones por el agregado de FMP. Así se observó, en efecto, pero la enzima resultó muy lábil y los resultados difíciles de reproducir. Se adoptó entonces la fracción  $P_{30}$  tal cual, que conservada a  $-20^{\circ}\text{C}$  resultó estable y proporcionó siempre datos muy reproducibles.

La Tabla 13 muestra otra serie de resultados, confirmando que solo la combinación FMP - Triton X-100 es capaz de estimular

Tabla 13. Efecto de F y FMP

Condiciones de incubación	( $^{14}\text{C}$ ) hexosa líposoluble (pmoles/mg proteína)
Sin adiciones	608
+ Triton X-100	553
+ F	664
+ FMP	764
+ Triton X-100 y F	716
+ Triton X-100 y 10 F	760
+ Triton X-100 y FMP	6092

Se incubó en las condiciones tipo con enzima  $P_{30}$  (25 ug proteína), 0.62 nmoles de UDP-( $^{14}\text{C}$ )Gal (154.5 uCi/umol) y donde se indica 0.25 nmoles de FMP, 0.6% de Triton X-100, 0.25 y 2.5 nmoles de ficaprenol (F y 10 F respectivamente).

(unas 10 veces) la incorporación de hexosa. El ficaprenol, en exceso y aun en presencia de Triton X-100 no tiene efecto significativo.



Con este sistema se buscaron las condiciones óptimas de incubación. La Figura 17 muestra el efecto de la concentración de FMP. Se llegó a una meseta utilizando aproximadamente 25  $\mu\text{M}$  y se obtuvo una incorporación de ( $^{14}\text{C}$ ) galactosa correspondiente a un 60% del UDP-( $^{14}\text{C}$ )-Gal presente en el incubado.

El efecto de la concentración de UDP-Gal se muestra en la Figura 18.

Como era de esperar tanto sin adiciones como en presencia de Triton X-100 no hubo mayores variaciones en la incorporación a material soluble en butanol. En presencia de FMP y detergente en

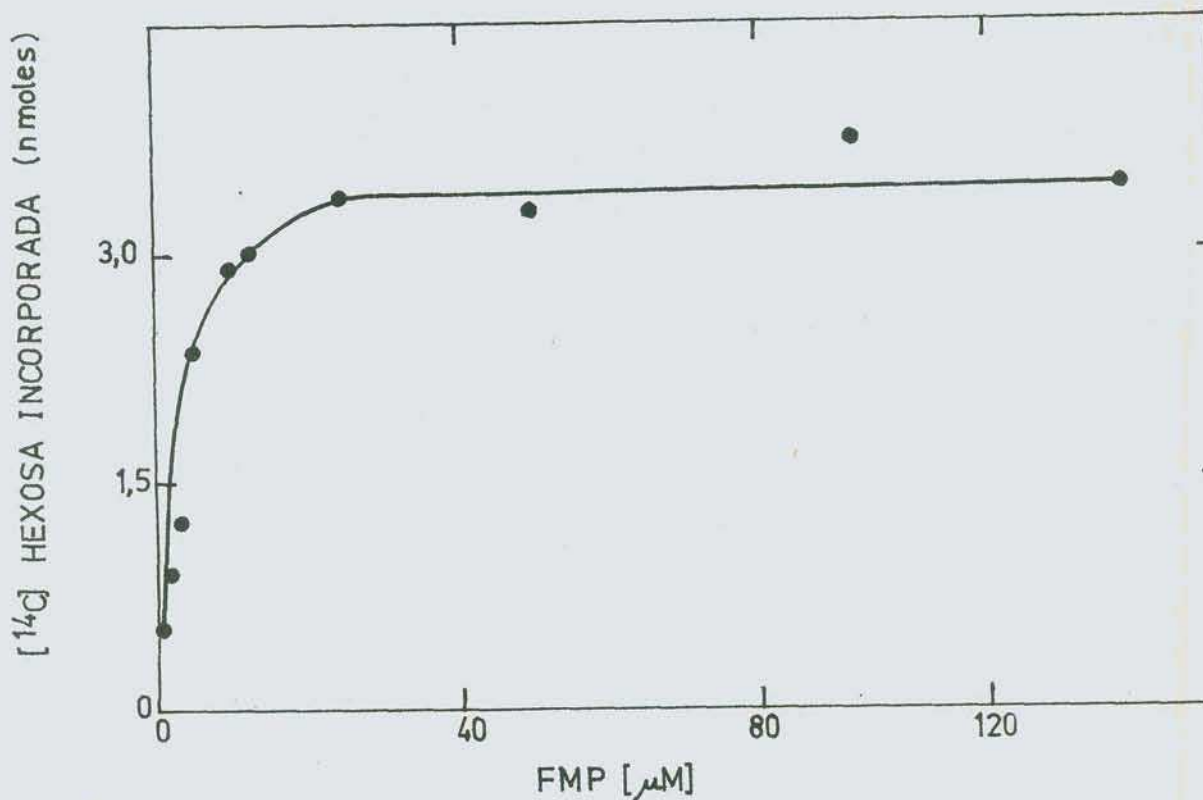


Figura 17: Efecto de la concentración de FMP. La incubación se efectuó en las condiciones tipo con 0.6 nmoles de UDP-( $^{14}\text{C}$ )-Gal (153.8  $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ ), 0.6% de Triton X-100, enzima  $\text{P}_{30}$  (92  $\mu\text{g}$  proteína) y las cantidades de FMP que se indican.

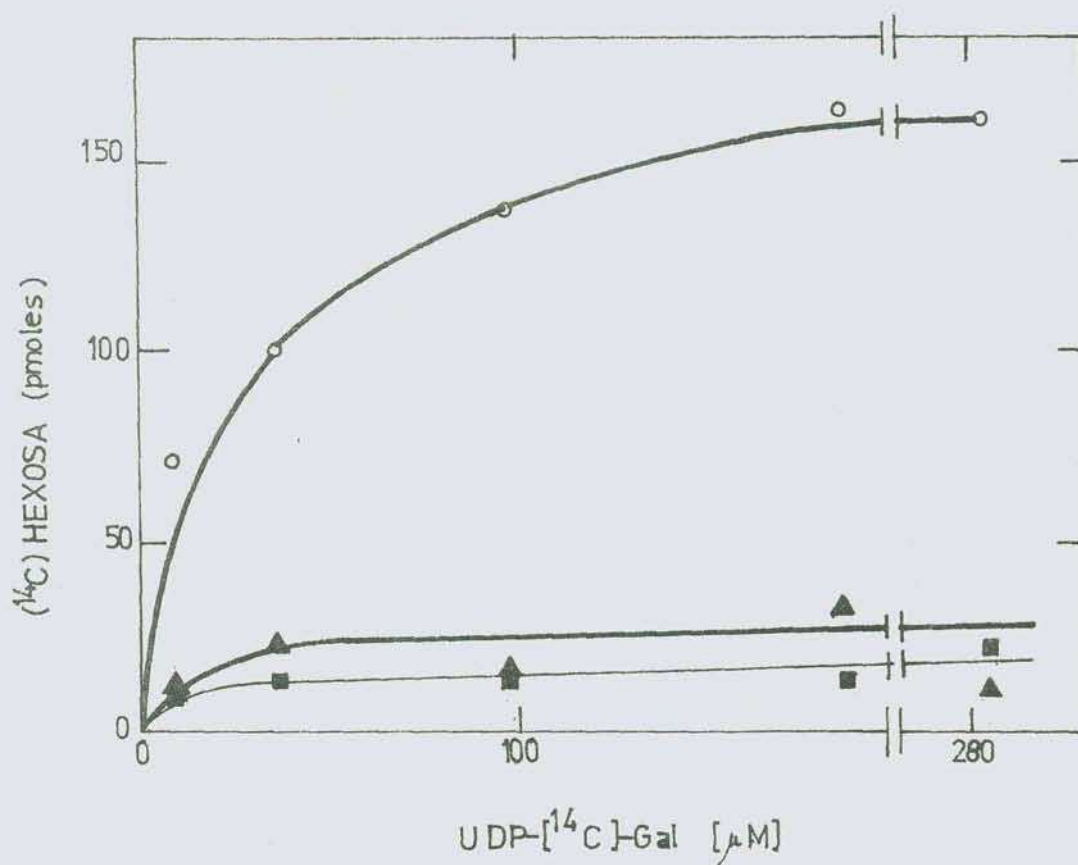


Figura 18: Efecto de la concentración de UDP-(<sup>14</sup>C)-Gal. Las condiciones fueron las de la incubación tipo excepto que se añadieron las cantidades de UDP-(<sup>14</sup>C)-Gal indicadas en la Figura, (■—■) sin adiciones; (▲—▲) Triton X-100 0.6%, (O—O) 0.2 nmoles de FMP y 0.6% de Triton X-100.

cambio se vió un gran estímulo alcanzándose una meseta a una concentración de UDP-Gal de 186 μM, correspondiente a unos 0.16 nmoles de hexosa incorporada. Inicialmente había 0.2 nmoles de FMP, es decir, que se utilizó aproximadamente un 70% del FMP presente.

La Figura 19 muestra las variaciones de incorporación en función del tiempo.

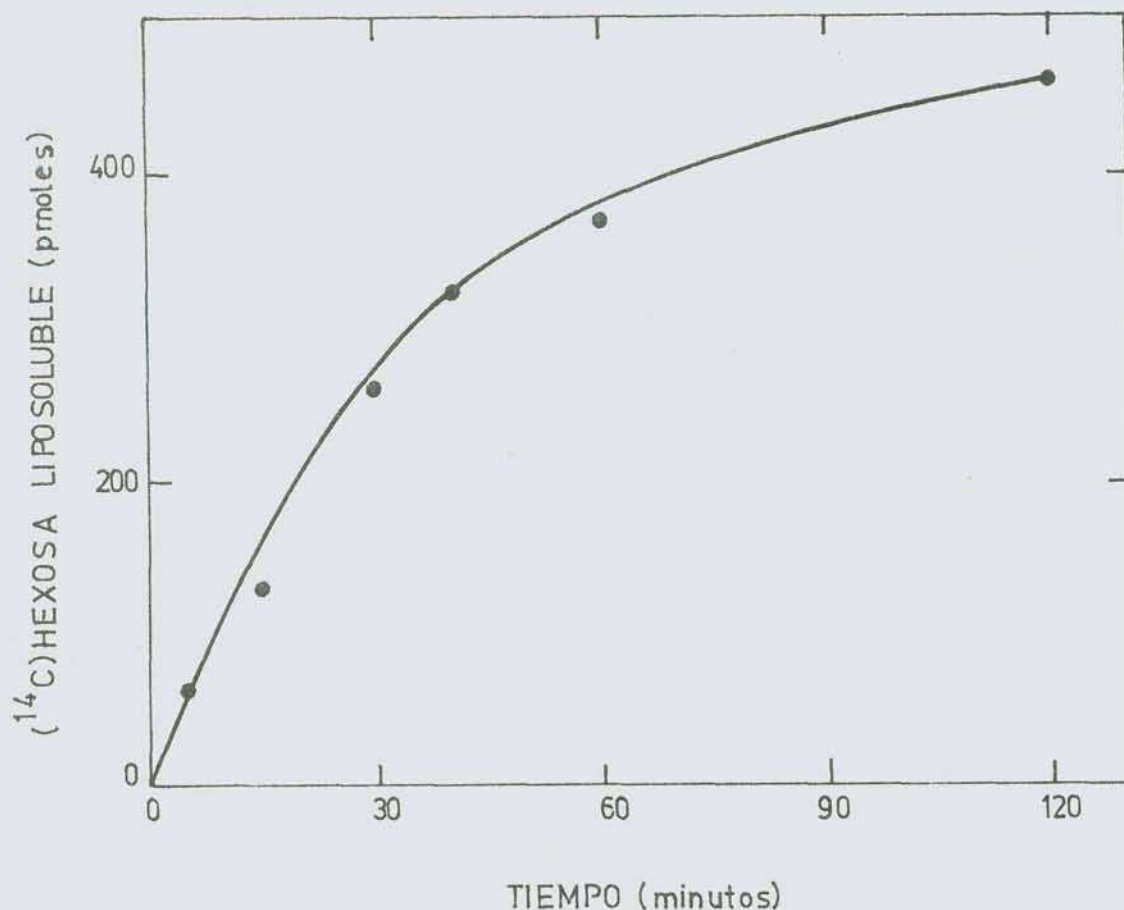


Figura 19: Incorporación de ( $^{14}\text{C}$ ) hexosa en función del tiempo. Condiciones de la incubación tipo. Se utilizaron 0.6 nmoles de UDP- $(^{14}\text{C})$ -Gal (90.6 uCi/umol), 2.0 nmoles de FMP, 0.6% de Triton X-100 y enzima  $\text{P}_{30}$  (25 ug proteína).

Puede verse que la incorporación de galactosa fue casi lineal en los primeros 30 minutos y luego aumentó suavemente hasta unas dos horas de incubación, tiempo en el que se logró una incorporación de ( $^{14}\text{C}$ )galactosa correspondiente a un 75% del UDP- $(^{14}\text{C})$ -Gal presente en la incubación.

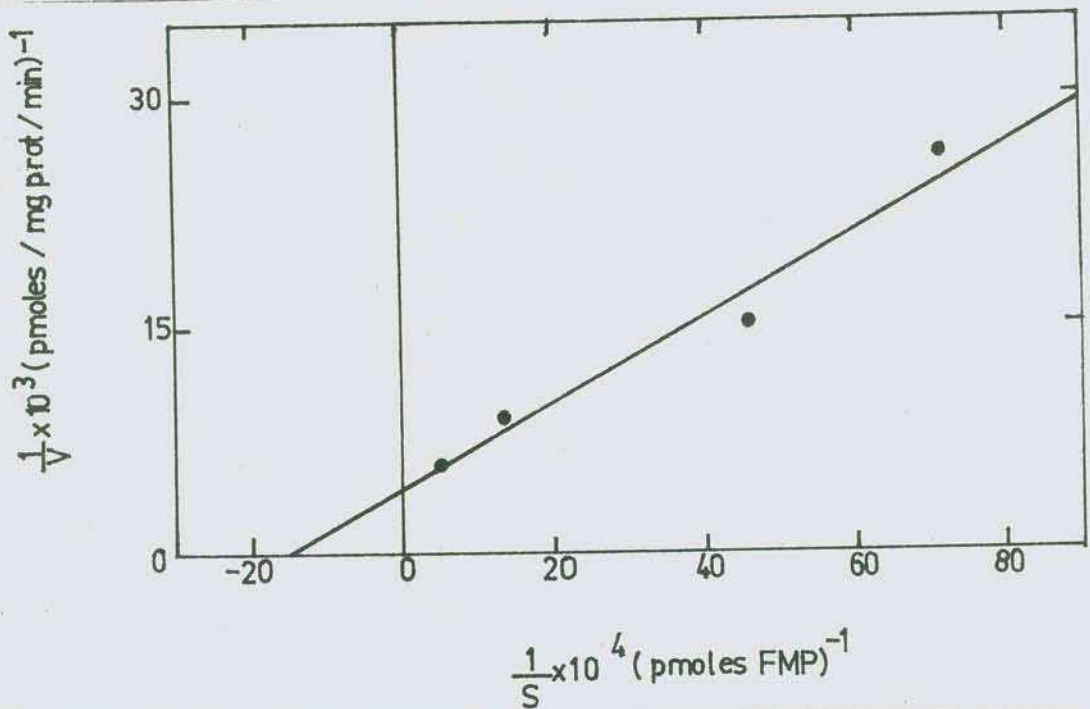
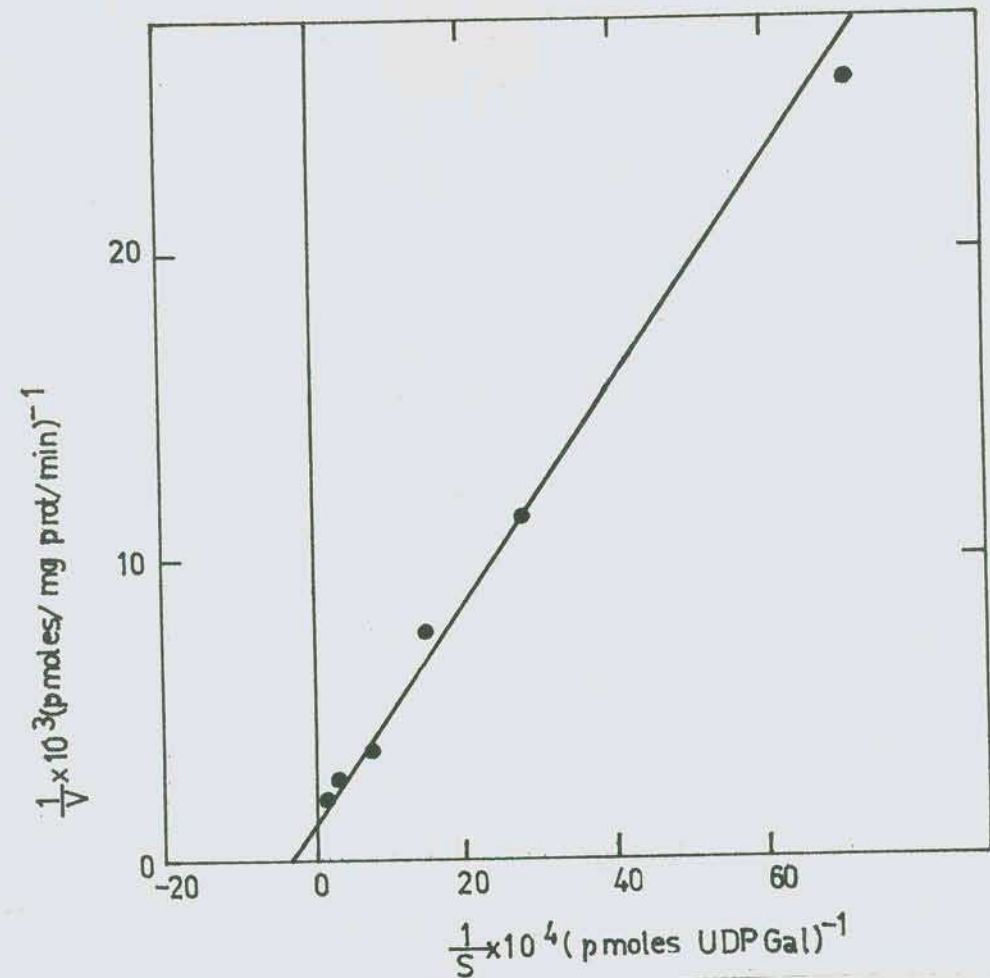


Figura 20: Gráficos de Lineweaver-Burk para UDP-Gal (a) y FMP (b).  
 (a) Para cada punto del gráfico se efectuaron curvas de tiempo: 5, 10 y 15 minutos de incubación en presencia de 18 nmoles de FMP, 0.6% de Triton X-100, enzima P<sub>30</sub> (92 ug proteína) y las cantidades de UDP-(<sup>14</sup>C)-Gal que se indican en cada caso. (b), en este caso las incubaciones fueron de 3, 6 y 9 minutos con 0.6% de Triton X-100, 26 nmoles de UDP-(<sup>14</sup>C)-Gal (11 uCi/umol), enzima P<sub>30</sub> (92 ug proteína) y las cantidades de FMP que se señalan en cada caso.



En la Figura 20 se observan 2 gráficos de Lineweaver-Burk: para UDP-Gal y FMP. Los  $K_m$ s aparentes obtenidos de esta forma fueron de  $3-6 \times 10^{-5}$  M para UDP-Gal y de aproximadamente  $1 \times 10^{-5}$  M para el FMP (corregido por la cantidad de aceptor endógeno presente en la preparación enzimática usada).

Finalmente, el efecto que ejercen diferentes detergentes en la síntesis de material liposoluble se muestra en la Figura 21. Se observa que las mejores incorporaciones se obtuvieron con Triton X-100: a una concentración de 0.2% se llega a una meseta que dentro del rango estudiado (0.2-2.4%) se mantiene constante.

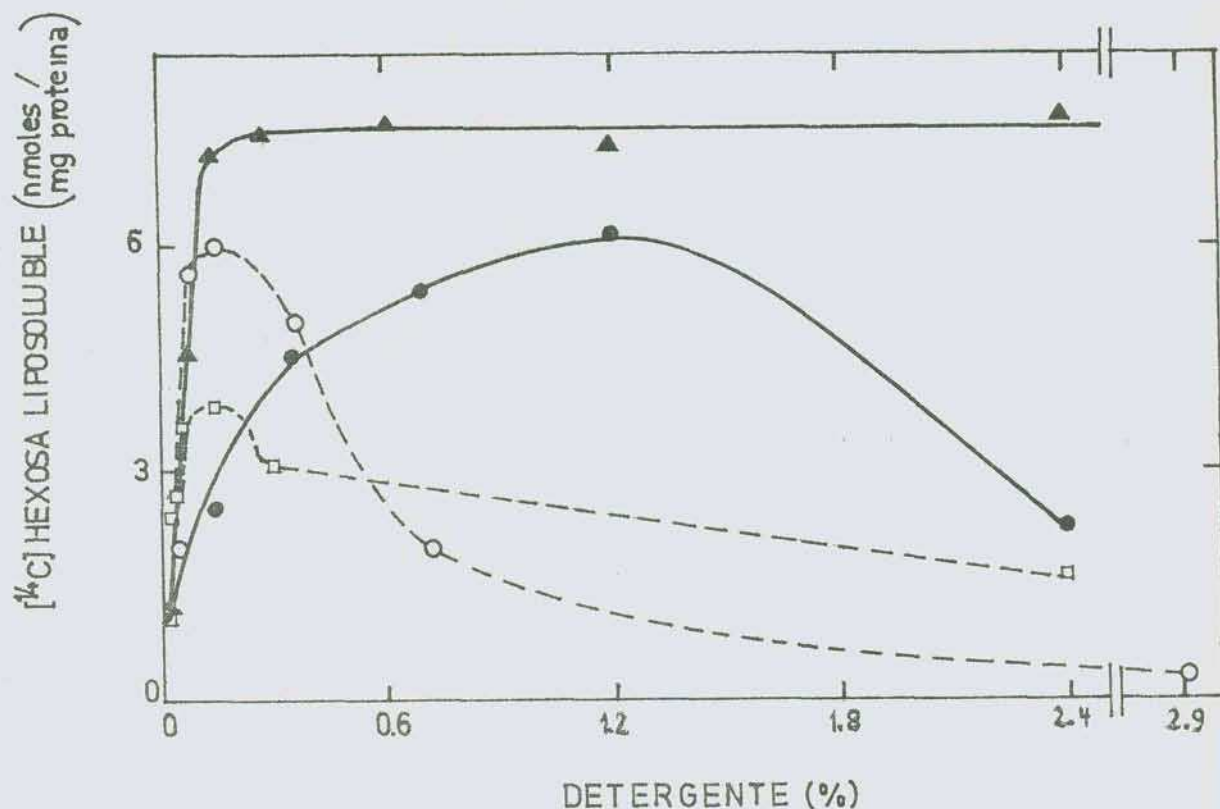


Figura 21: Efecto de diferentes detergentes en la formación de material liposoluble. Las condiciones fueron las de la incubación tipo con 0.62 nmoles de UDP-( $^{14}$ C)-Gal (92.6 uCi/umol), 3.6 nmoles de FMP, enzima P30 y las cantidades de detergente que se señalan en cada caso. (▲—▲) Triton X-100, (○--○) desoxicolato de sodio, (□--□) Lubrol y (●—●) Zonyl A.

### Análisis del producto

El análisis del material soluble en butanol obtenido con enzima P<sub>30</sub>, FMP, Triton X-100 y UDP-Gal, confirmó que se trataba de Lípido-P-Gal.

Por cromatografía en papel con los solventes E y F (Figura 22) se observa un solo pico con las movilidades esperadas (0.85 y 0.90 respectivamente).

Por cromatografía en columna de DEAE-celulosa (Figura 23) se observa también un solo pico, que eluye a una concentración 0.1-0.2 M de acetato de amonio. Por hidrólisis a pH 2 este material se descompuso en un 80-90%. Cromatografía en papel con el solvente H

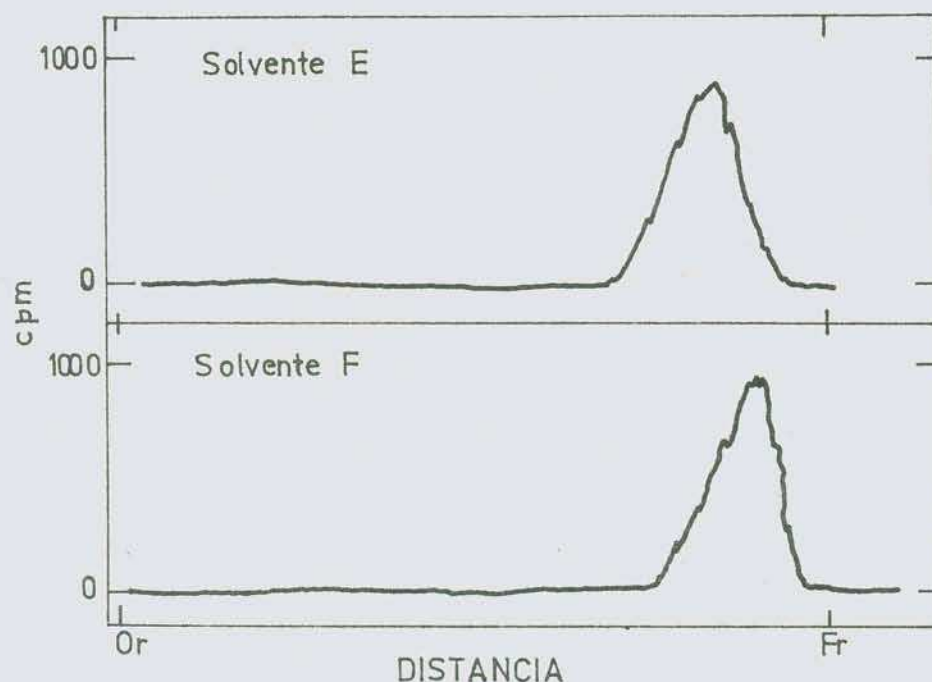


Figura 22: Cromatografía en papel del material soluble en butanol.  
Solventes E y F.

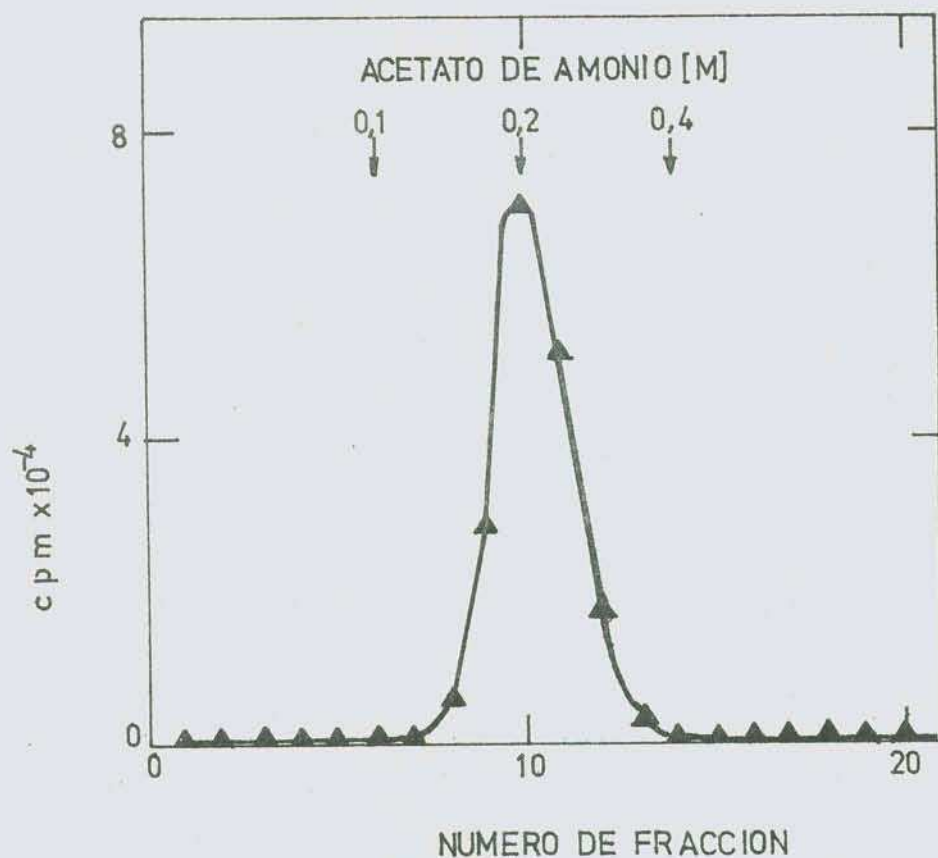


Figura 23: Cromatografía en columna de DEAE-celulosa del material liposoluble obtenido a partir de UDP-( $^{14}\text{C}$ )-Gal. La columna de 0.8 x 31 cm se desarrolló como se indica en Materiales y Métodos.

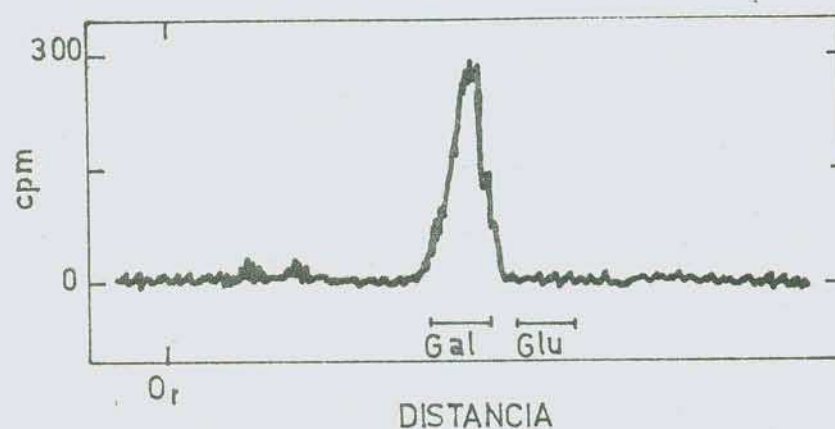


Figura 24: Cromatografía en solvente II del material purificado por cromatografía en DEAE-celulosa y tratado a pH 2. (fase acuosa).

de la fracción acuosa de dicha hidrólisis (Figura 24) permitió observar solamente galactosa radioactiva.

Tratamiento fenólico.- El producto de incorporación soluble en butanol se trató también con fenol. La degradación se llevó a cabo sobre 3 productos diferentes:

- El obtenido en una incubación tipo, sin adicionar ni Triton X-100 ni FMP (I).
- El obtenido en una incubación tipo, con 0.6% final de Triton X-100 (II).
- El obtenido en una incubación tipo, con 0.6% final de Triton X-100 y 0.25 nmoles de FMP (III).

En la Figura 25 se muestran los resultados. Como puede observarse los perfiles obtenidos con el lípido endógeno (I y II) o con

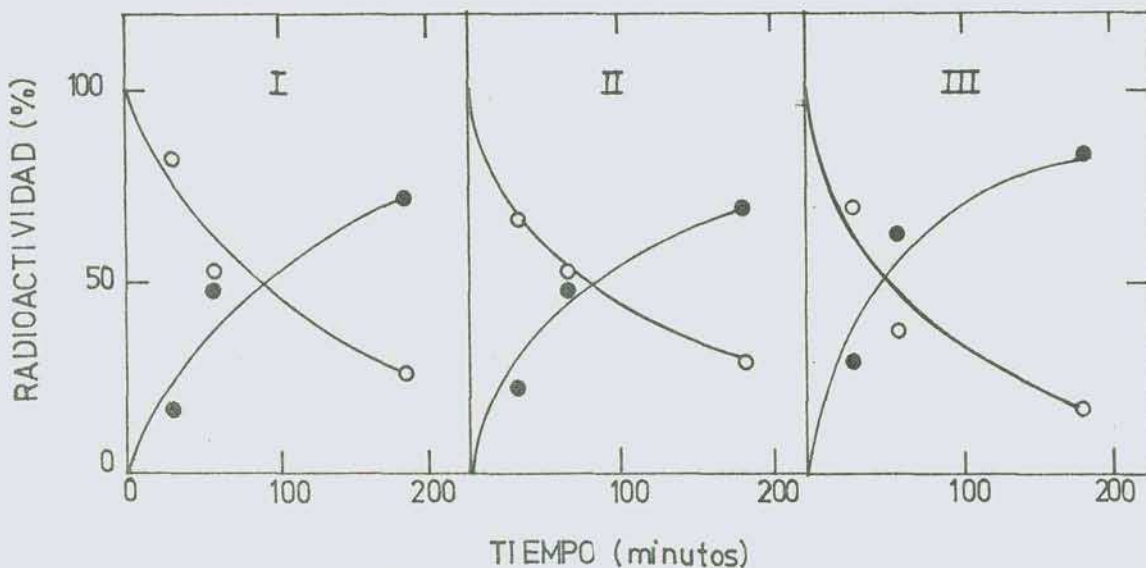


Figura 25: Tratamiento fenólico. Cada una de las sustancias se trató con fenol 50% durante los tiempos indicados, en la forma descrita en Materiales y Métodos. (O) Fase fenólica, (●) fase acuosa.



detergente y FMP (III) son casi idénticos. En tres horas la degradación fué casi total.

Las fases acuosas del tratamiento fenólico sometidas a electroforesis se comportaron como Gal-1-P (Figura 26) en todos los casos. Las zonas radioactivas se eluyeron y cada una de ellas se

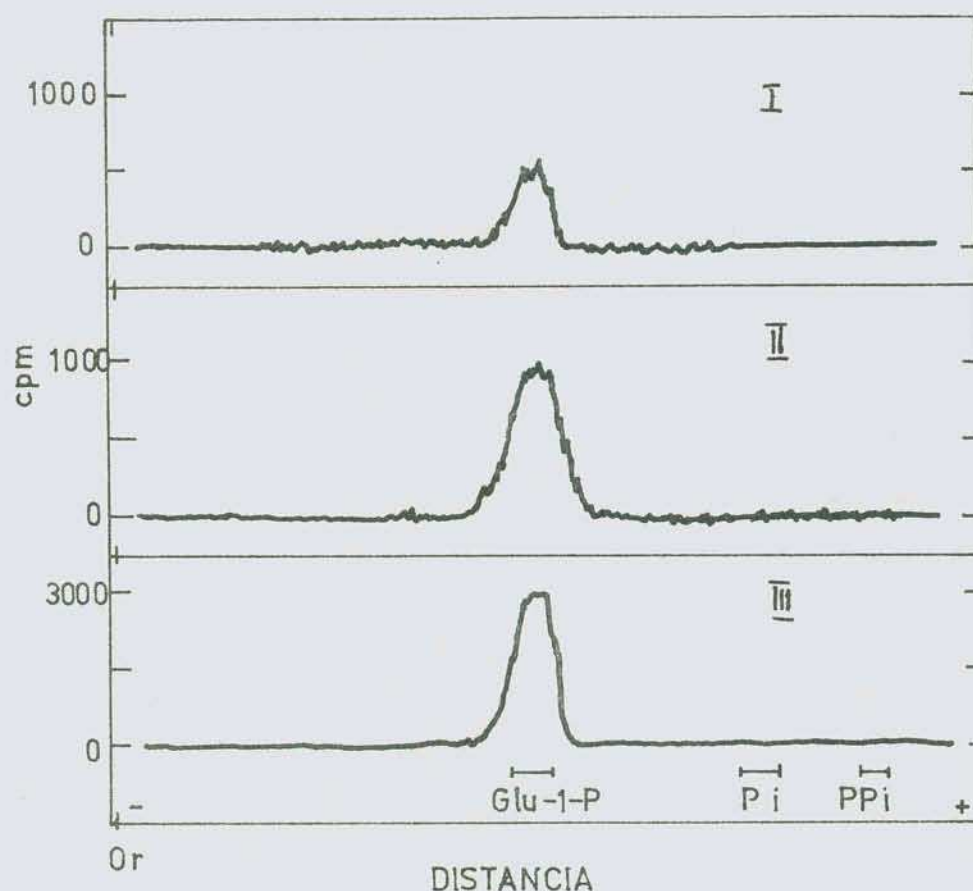


Figura 26: Electroforesis en acetato de piridinio de las fases acuosas del tratamiento fenólico de los productos I, II y III.

dividió en 2 porciones. Una se trató con fosfatasa alcalina y la otra se hidrolizó a pH 1 (0.1 M HCl, 10 minutos, 100°C). El producto de la incubación con fosfatasa alcalina, por electroforesis, se

comportó como una sustancia neutra en los tres casos.

El producto de la hidrólisis ácida cromatografiado en papel en el solvente II migró en todos los casos como galactosa.

El producto era pues Gal-1-P.

Reducción catalítica.— Sometidos a este tratamiento tanto el producto obtenido con el aceptor endógeno (Lípido-P-( $^{14}\text{C}$ )-Gal) como el formado en presencia de FMP y Triton X-100 se degradaron en forma practicamente total (Tabla 14). Los productos de degradación fueron galactosa, o mezclas de galactosa y Gal-1-P, según los casos.

Tabla 14: Reducción catalítica.

Producto	Fase butanólica (cpm)	Fase acuosa (cpm)	Degradación (%)
Lípido-P-( $^{14}\text{C}$ )Gal	358	6000	95
FMP-( $^{14}\text{C}$ )Gal (*)	298	6370	96
DolMP-( $^{14}\text{C}$ )Gal (*)	5665	2805	33

La reducción catalítica se efectuó como se indica en Materiales y Métodos. (\*) Estos preparados contenían un 18% de Lípido-P-( $^{14}\text{C}$ )Gal, calculado en base a la cantidad de aceptor endógeno presente en la preparación enzimática utilizada para sintetizarlos.

Por otra parte utilizando otro aceptor exógeno, el DolMP (ver "Activación por otros extractos lipídicos") también se obtuvo incorporación de galactosa a material liposoluble, pero éste resultó resistente a la reducción catalítica, a diferencia de los otros dos casos. Esto indicaría que el Lípido-P-Gal es de naturaleza semejante al FMP-Gal, es decir, de tipo alílico y no  $\alpha$ -saturado como el DolMP-Gal.

Configuración del enlace galactosa-fosfato.— Para determinar la configuración del enlace azúcar-fosfato se investigó la formación de 1,6 anhidrogalactosano a partir de un producto purificado por cromatografía en columna de DEAE-celulosa. Por cromatografía en papel con Solvente H el compuesto obtenido se comportó como auténtico 1,6 anhidrogalactosano ( $R_{gal}=2.2$ ) (30). Como prueba confirmatoria ambos compuestos se eluyeron, se hidrolizaron en medio ácido (1N HCl, 3 horas, 100°C) y luego se cromatografiaron en el Solvente H: migraron con la movilidad de la galactosa.

Todos estos resultados indican que el lípido-galactosa obtenido a partir de FMP tiene propiedades análogas al obtenido con el aceptor endógeno, o sea, Lípido-P- $\beta$ -Gal.

Confirmación de que el FMP es sustrato de la enzima galactosilante.—Para confirmar que la preparación de FMP utilizada era sustrato de la enzima galactosilante y que las estimulaciones observadas no se debían a efectos indirectos se llevaron a cabo varios experimentos. Se usó tanto FMP no radioactivo como marcado con  $^{32}P$ .

Para ver si se comportaba como otros prenil-fosfatos conocidos, tales como DolMP, el FMP preparado químicamente se cromatografió en placas de sílica gel G. Efectuada la corrida se eluyó la placa fraccionada en bandas y se midió la capacidad estimulante de cada uno de los eluidos (Figura 27). La máxima estimulación correspondió a la zona de  $R_f=0.6-0.7$ , aunque también se observó un pequeño efecto en la zona del origen. En estas condiciones el DolMP migra con un  $R_f$  de aproximadamente 0.7 y un pirofosfato permanece en el origen (186).



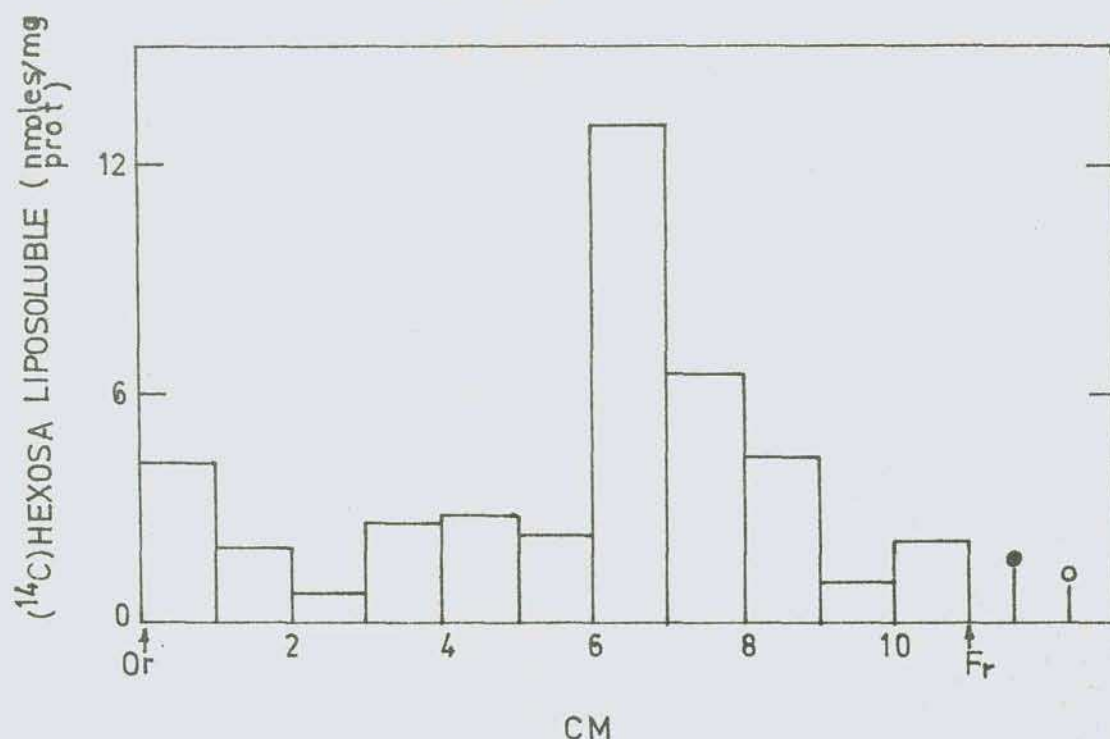


Figura 27: Cromatografía de FMP en capa delgada. Se utilizaron placas de sílica gel G lavadas, y Solvente C. Se eluyeron bandas de 1 cm de ancho y en los eluidos llevados a seco se midió capacidad estimulante, en las condiciones tipo. Las incubaciones se efectuaron con 0.61 nmoles de UDP-(<sup>14</sup>C)-Gal (152 uCi/umol), 0.6% de Triton X-100 y enzima P<sub>30</sub> (25 ug proteína). Se midió incorporación a material soluble en butanol. (○) control sin Triton X-100 ni eluido, (●) control con Triton X-100 sin eluido.

Los resultados más concluyentes se obtuvieron utilizando como aceptor exógeno FMP marcado con <sup>32</sup>P.

Fue necesario establecer primero la pureza del preparado de FM<sup>32</sup>P. Por cromatografía en capa delgada en Solvente C se observaron dos picos de radioactividad (en el origen y con R<sub>f</sub>=0.65) coincidentes con lo visto con el FMP no radioactivo (Figura 28).





Figura 28: Cromatografía de FM<sup>32</sup>P en capa delgada. Se utilizaron placas de sílica gel G lavadas, y Solvente C.

Pero corrido con Solvente D el perfil obtenido fué más complejo (Figura 29) pues se observaron cuatro compuestos: en el origen

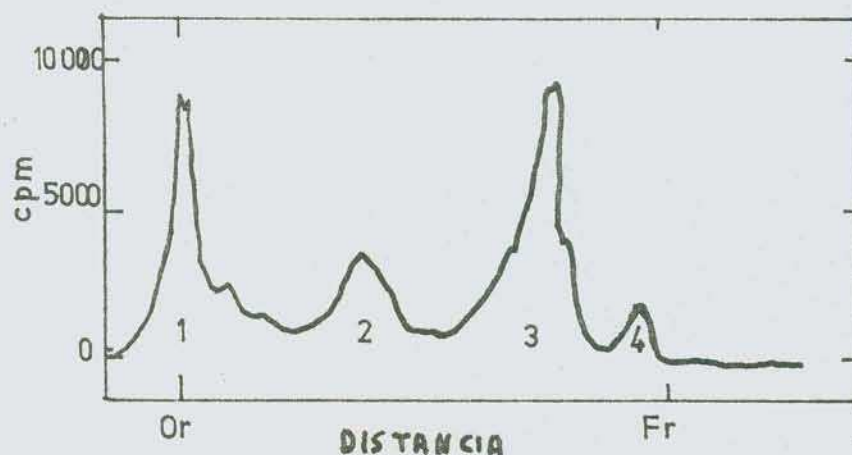


Figura 29: Cromatografía de FM<sup>32</sup>P en capa delgada. Se utilizaron placas Eastman y Solvente D.

(compuesto 1) y con  $R_{fs}$  de 0.4 (compuesto 2), 0.7 (compuesto 3) y 0.95 (compuesto 4). Los compuestos 3 y 4 pudieron eluirse con cierta

facilidad (80-90%) utilizando 0.1 M  $\text{NH}_4\text{OH}$  en metanol. Corridos nuevamente en el mismo sistema mantuvieron su movilidad.

Los compuestos 1 y 2 en cambio, resultaron muy difíciles de recuperar, aun en las condiciones más variadas. En ningún caso

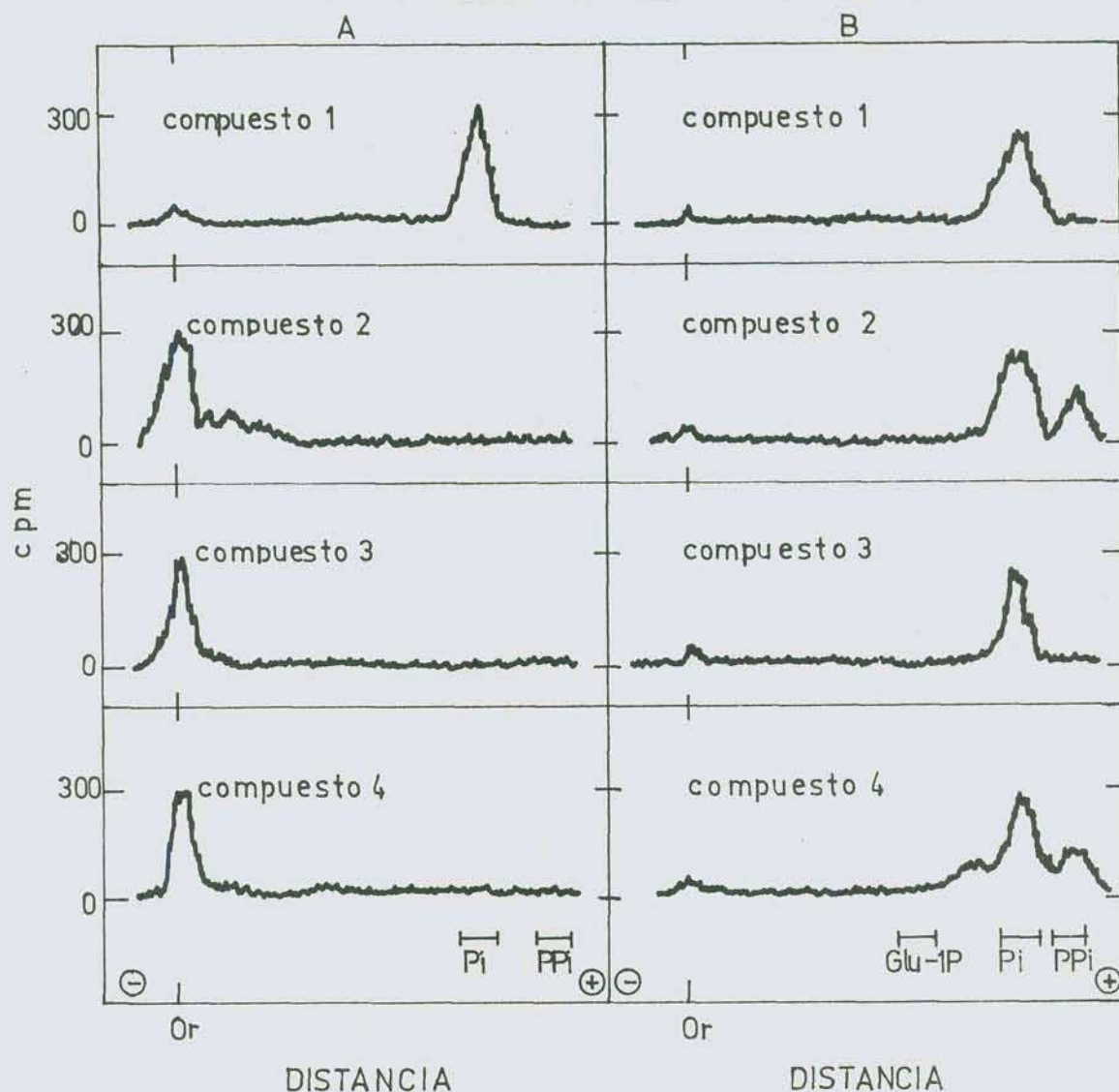


Figura 30: Electroforesis en buffer acetato de piridinio de los 4 compuestos aislados del preparado de  $\text{FM}^{32}\text{P}$  (Figura 29). (A) sin hidrolizar, (B) después de hidrólisis a pH 2.

se logró eluir más de un 5-10% de la radioactividad.

Los cuatro compuestos se sometieron a electroforesis directamente y previa hidrólisis a pli 2 (Figura 30). El compuesto 1 resultó ser fosfato inorgánico pues corrió como Pi tanto antes como después de la hidrólisis. No así los tres que, si bien, sin tratar con ácido, no se movieron del origen, sus productos de hidrólisis fueron diferentes. Como se observa en la Figura, el compuesto 3 produjo solo Pi, en cambio el 2 produjo Pi y P<sub>1</sub>i, y el 4, Pi, P<sub>1</sub>i y un producto no identificado de movilidad algo menor ( $R_{P_{1}i} = 0.70-0.75$ ).

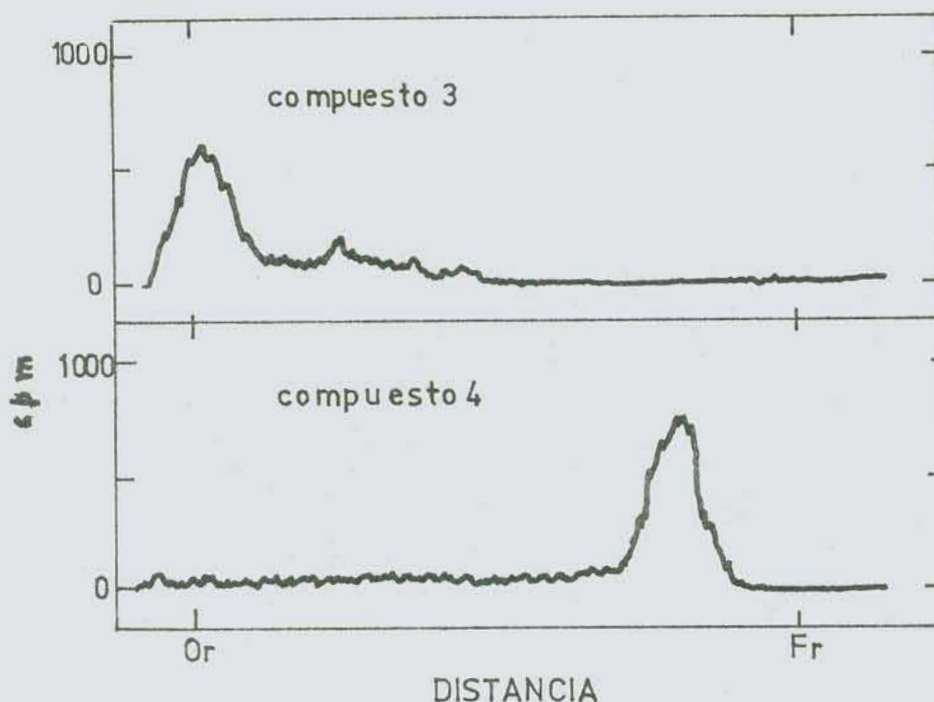


Figura 31: Cromatografía en papel de los compuestos 3 y 4 (Figura 29), con solvente E.

Los compuestos 3 y 4 se corrieron también en papel con el solvente alcalino E (Figura 31). El pico 3 se descompuso casi

totalmente: solo se observó en la zona del origen un pico levemente difuso que se pudo eluir con agua y se comportó como Pi en electroforesis. El pico 4, en cambio, se movió casi con el frente del solvente.

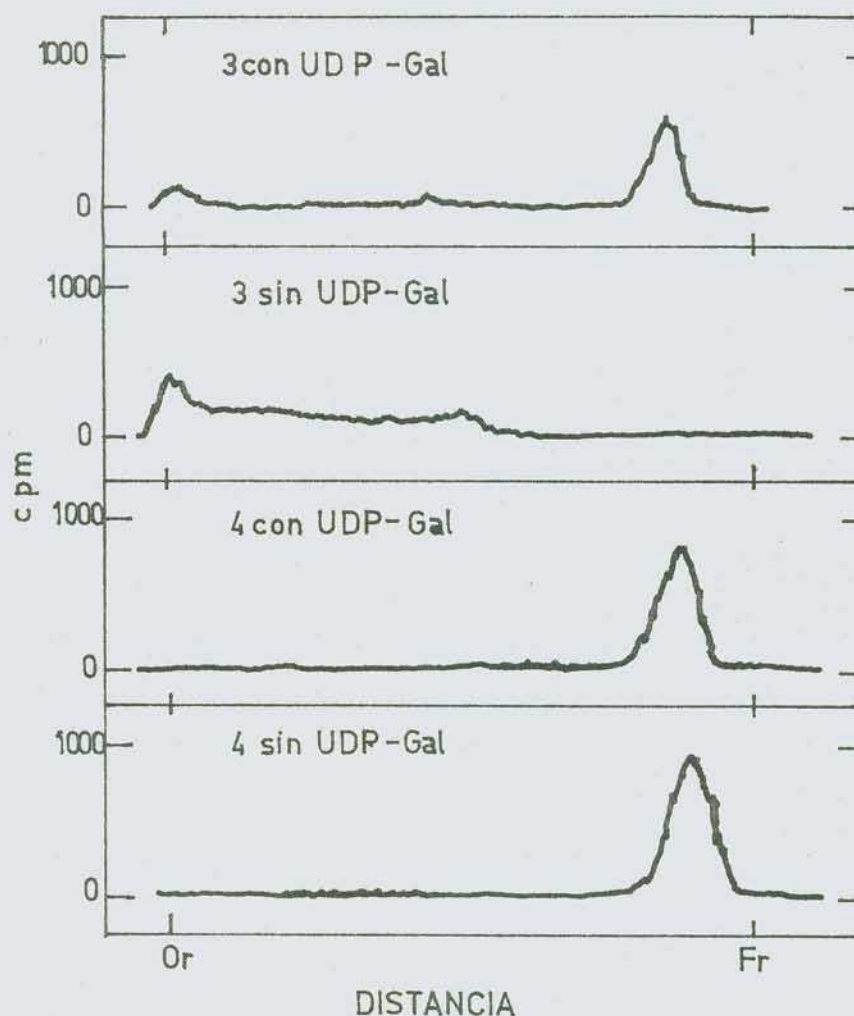


Figura 32: Incorporación de galactosa a los compuestos 3 y 4 (Figura 29). Condiciones de incubación tipo (90 minutos): enzima P<sub>30</sub> (54 ug proteína), 0.6% de Triton X-100, los compuestos 3 y 4 como aceptores exógenos y 31.0 nmoles de UDP-Gal, donde se indica. Alícuotas de los productos liposolubles se analizaron por cromatografía en papel en Solvente E.



Para saber cual de estos dos compuestos era el  $\text{FM}^{32}\text{P}$  se hizo el siguiente experimento: se los utilizó como aceptores exógenos en presencia y en ausencia de UDP-Gal no radioactivo. Alícuotas de los extractos butanólicos obtenidos se analizaron por cromatografía en papel con el Solvente E (Figura 32). Como era de esperar de acuerdo a lo visto en la Figura 31 para el compuesto 4, no hubo diferencia en la incubación realizada con o sin el nucleótido-azúcar. En cambio el compuesto 3, en presencia de UDP-Gal, produjo una sustancia que migró cerca del frente, con la movilidad del Lípido-P-Gal, ausente en el control sin UDP-Gal, pues, como se indicó, el  $\text{FM}^{32}\text{P}$  parece descomponerse en este solvente.

El resto de los extractos butanólicos se trató con fenol (Tabla 15) y aunque los porcentajes de ruptura fueron bajos en general,

Tabla 15: Tratamiento fenólico del material marcado con  $^{32}\text{P}$  soluble en butanol.

Condiciones de incubación	fase fenólica (cpm)	fase acuosa (cpm)	ruptura (%)
Compuesto 3 con UDP-Gal	26.397	12.705	32.5
Compuesto 3 sin UDP-Gal	32.261	9.592	22.9
Compuesto 4 con UDP-Gal	25.142	6.743	21.1
Compuesto 4 sin UDP-Gal	24.882	5.291	17.5

Tiempo de tratamiento: 3 horas

en el caso del compuesto 3 incubado con UDP-Gal fué máximo.

El análisis de las fracciones acuosas del tratamiento fenólico (Figura 33) indicó que solo el compuesto 3 sirve como aceptor exógeno de galactosa ya que sin UDP-Gal produjo solo Pi y

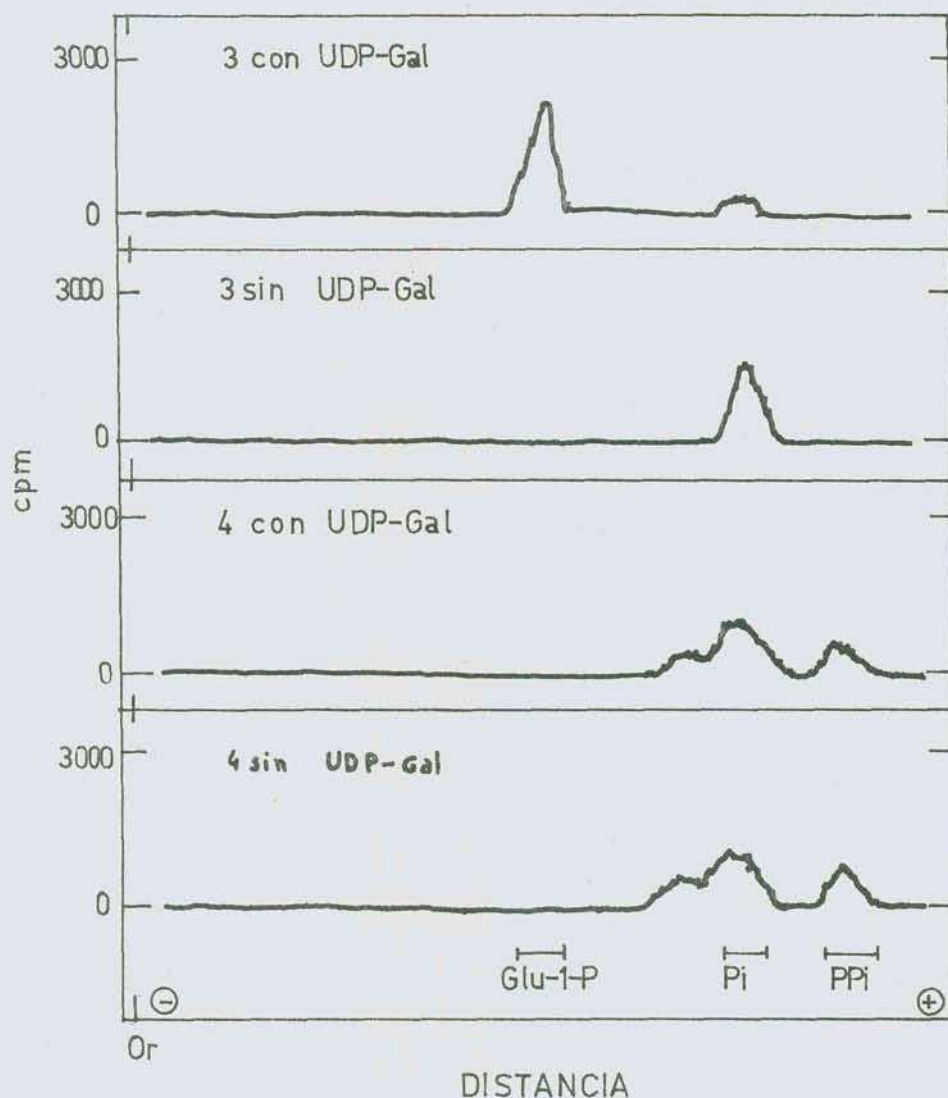


Figura 33: Electroforesis en papel de las fases acuosas del tratamiento fenólico (Tabla 15).

con UDP-Gal dió origen a Gal-1-P (90%) y Pi (10%). Por el contrario, el compuesto 4 dió el mismo perfil observado por hidrólisis a pH 2: una sustancia de  $R_{ppi} = 0.75$ , Pi y Ppi, y no mostró capacidad

aceptora ya que no liberó hexosa-P.

Ante todos estos resultados se concluyó que el compuesto 3 era el  $\text{FM}^{32}\text{P}$ , por lo que se continuó trabajando solamente con él.

Caracterización de FMP-Gal doblemente marcado.

El hecho de que, en presencia de  $\text{FM}^{32}\text{P}$ , se obtuviera un producto capaz de liberar hexosa- $^{32}\text{P}$  por tratamiento con fenol, ya

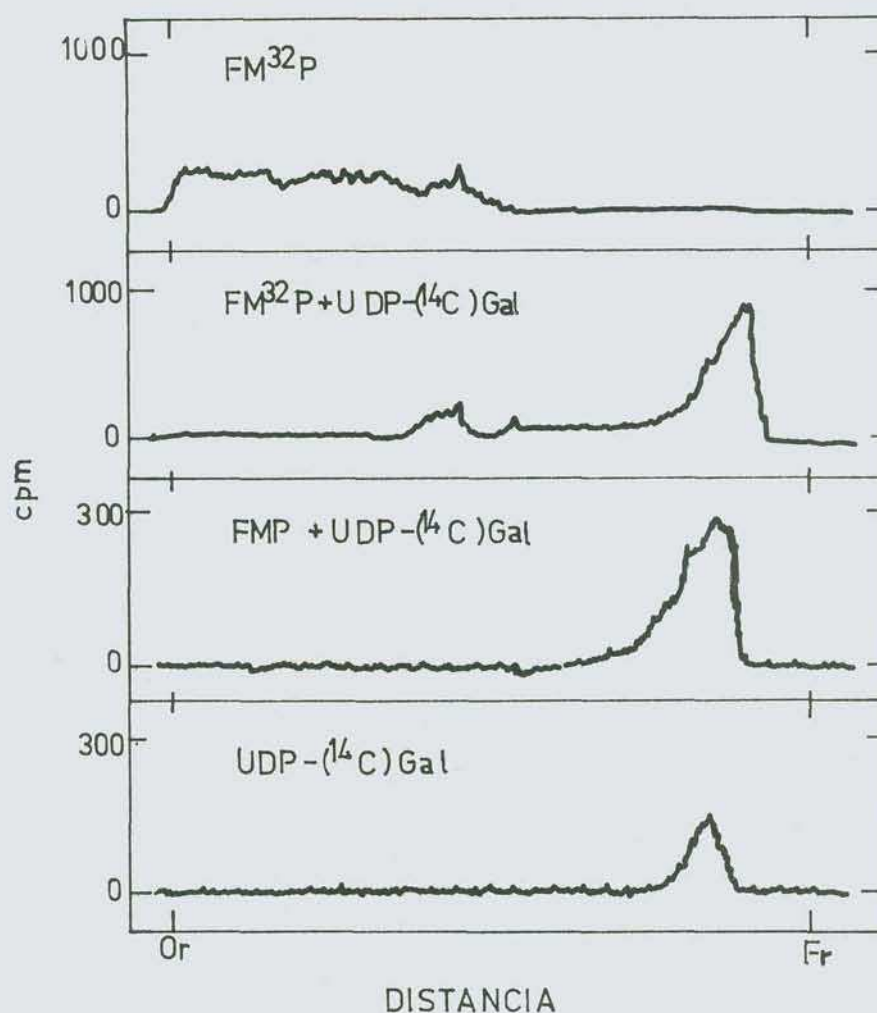


Figura 34: Formación de productos doblemente marcados. Incubación tipo; se efectuó durante 90 minutos con enzima  $\text{P}_{30}$  (54 ug proteína), y donde se indica: 2.87 nmoles de  $\text{FM}^{32}\text{P}$  (51 cpm/pmol); 2.7 nmoles de FMP no radioactivo,  $\text{UDP-(}^{14}\text{C)Gal}$ , 34.5 nmoles (37 cpm/pmol) y Triton X-100 0.6%. Los extractos butanólicos se analizaron por cromatografía en solvente E.

se consideró un argumento bastante sólido en el sentido de que el FMP exógeno era un verdadero sustrato de la enzima. No obstante, se quiso confirmar estos resultados efectuando un experimento con doble marca: FM<sup>32</sup>P y UDP-(<sup>14</sup>C)-Gal.

Para ello se incubó en las condiciones ya vistas, con FM<sup>32</sup>P solo y en presencia de UDP-(<sup>14</sup>C)-Gal. Se hicieron además dos controles: uno empleando FMP frío y UDP-(<sup>14</sup>C)-Gal y otro usando solo UDP-(<sup>14</sup>C)-Gal, sin aceptor exógeno. Alícuotas de los extractos butanólicos obtenidos se cromatografiaron en Solvente E (Figura 34). Como puede observarse, nuevamente el FM<sup>32</sup>P, incubado en ausencia de UDP-Gal, se descompone. En presencia del nucleótido-azúcar, si bien queda algo de radioactividad en la zona del origen la mayor parte migra con la movilidad del Lípido-P-Gal como era de esperarse.

Por otra parte en los controles sin FM<sup>32</sup>P, con o sin agregado de FMP no radioactivo, solo se observa radioactividad cerca del frente del solvente. En los tres casos se cortó esta zona del papel y se midió radioactividad, discriminando <sup>32</sup>P y <sup>14</sup>C. Luego de deducida la contribución del lípido-fosfato endógeno, calculado con el control sin FMP, se llegó a una relación <sup>14</sup>C/<sup>32</sup>P de 1:1.13, para el producto obtenido con doble marca.

Como en el caso anterior, el resto de los extractos butanólicos se trató con fenol. Los resultados (Tabla 16) indican que el FM<sup>32</sup>P se degradó alrededor de un 20%. En los otros tres casos la ruptura fue mayor (45-50%), aunque con todo algo menor que la esperada (80-95%).



Tabla 16: Tratamiento fenólico del material soluble en butanol obtenido en el experimento con doble marca.

	Condiciones de incubación	Fase fenólica (cpm)	Fase acuosa (cpm)	Ruptura (%)
I	FM <sup>32</sup> P (*)	75.904	17.648	18.9
II	FM <sup>32</sup> P + UDP-( <sup>14</sup> C)-Gal	20.737	28.037	57.5
III	FMP no radioactivo + UDP-( <sup>14</sup> C)-Gal	4.930	6.494	56.8
IV	UDP-( <sup>14</sup> C)-Gal	6.018	4.726	44.0

(\*) En el caso de FM<sup>32</sup>P solo se midió <sup>32</sup>P, en todos los demás casos se midió <sup>14</sup>C. Los extractos butanólicos se obtuvieron como se señala en la leyenda de la Figura 34. El tratamiento con fenol al 50% se efectuó durante 3 horas a 68-70°C.

Análisis de las fracciones acuosas provenientes del tratamiento fenólico.— Como en los casos anteriores, las fases acuosas se sometieron a electroforesis (Figura 35).

Se observa la formación de hexosa-fosfato en todos los casos menos en el proveniente de la incubación con FM<sup>32</sup>P solo, (I) en cuyo caso el producto fué Pi. El material con doble marca también produjo un poco de Pi (3%). En ambos casos se confirmó su identidad por cromatografía en papel con Solvente G. Las zonas con movilidad de hexosa-fosfato (II, III y IV Figura 35) se cortaron, midieron y eluyeron. En el producto con doble marca (II) se obtuvo una relación <sup>14</sup>C/<sup>32</sup>P de 0.8 (corregido por el contenido inicial de Lípido-P-Gal endógeno).

Los tres productos (II, III y IV) fueron tratados con fosfatasa alcalina y sometidos a hidrólisis a pH 1 (0.1 N HCl, 10 minutos 100°C). Luego se analizaron por electroforesis. III y IV

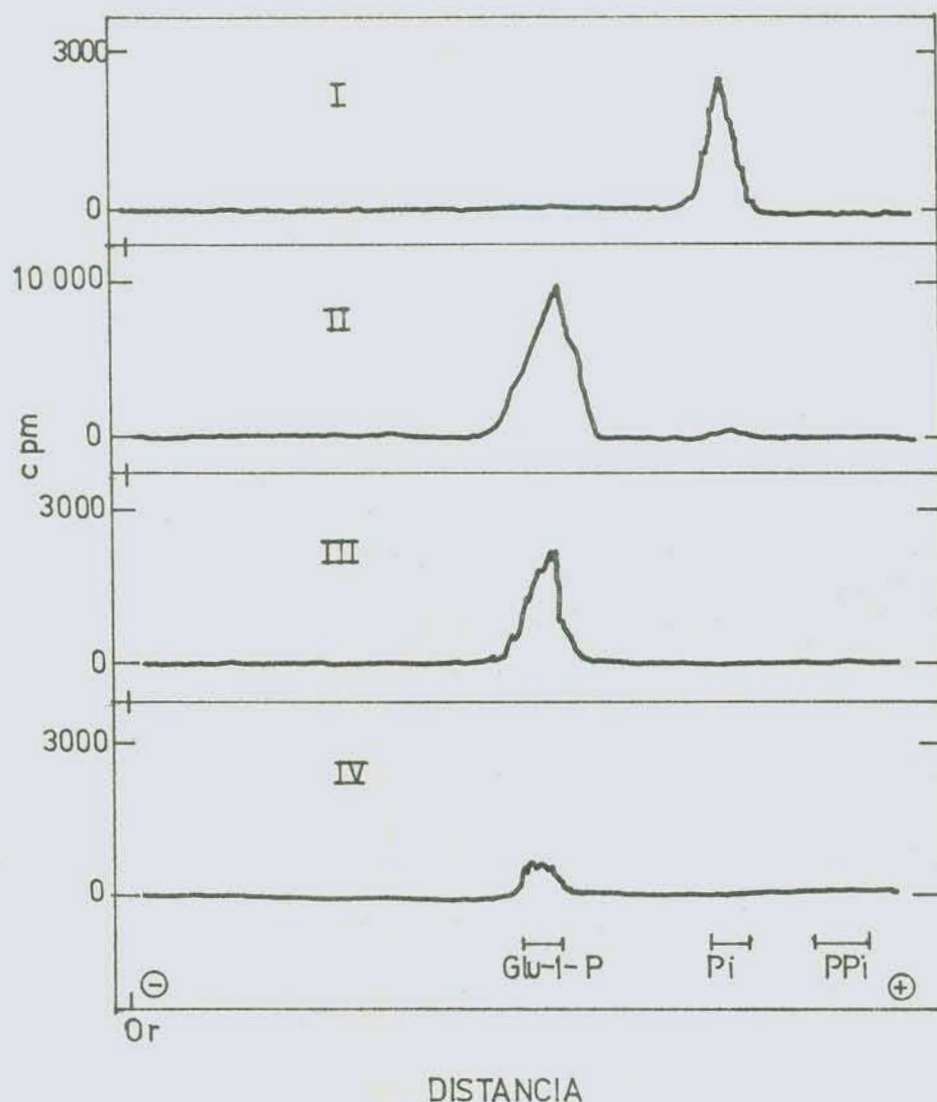


Figura 35: Electroforesis en acetato de piridinio de las fases acuosas obtenidas por tratamiento fenólico de los extractos butanólicos provenientes del experimento con doble marca.

produjeron en ambos casos una sustancia neutra. El producto con doble marca (II) tanto por tratamiento ácido como enzimático produjo 2 picos: uno neutro que contenía solo  $^{14}\text{C}$  y otro con la movilidad del  $\text{Pi}$  que solo contenía  $^{32}\text{P}$  (Figura 36). Para ambos tratamientos la

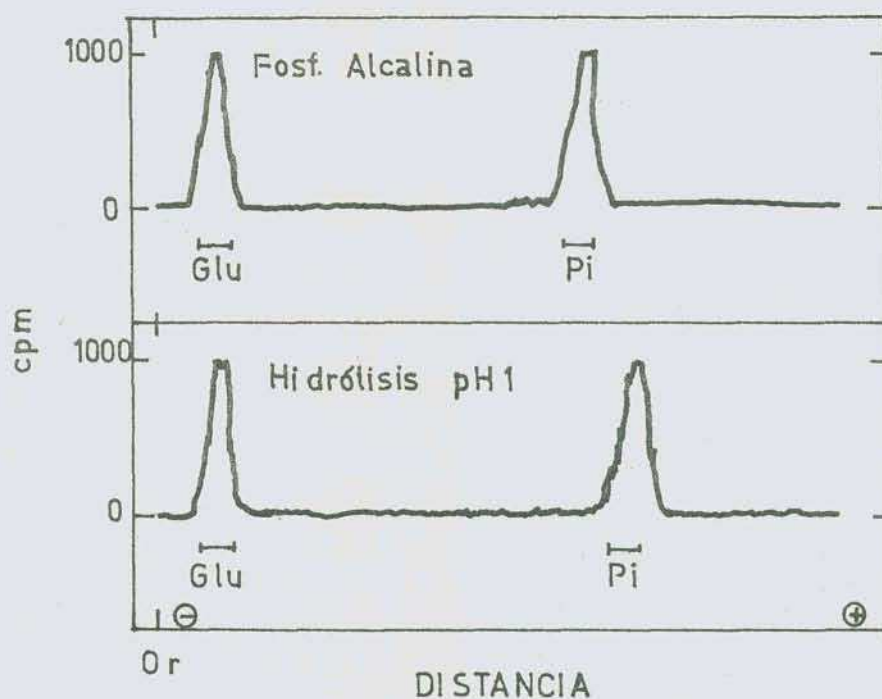


Figura 36: Electroforesis en papel con buffer acetato de piridinio de la hexosa-P doblemente marcada, tratada con fosfatasa alcalina o hidrólisis a pH 1.

relación  $^{14}\text{C}/^{32}\text{P}$  fué de 0.9 (corregido por el valor inicial del Lípido-P-Gal endógeno). La identidad de las zonas neutras de ambos tratamientos se confirmó por elución y subsecuente cromatografía con Solvente H: migraron como galactosa (Figura 37a). La identidad del Pi se confirmó por cromatografía en Solvente G (Figura 37b), donde migró como Pi.

Lo anterior confirma entonces el carácter de sustrato que posee el FMP.

Análisis de las fases orgánicas provenientes del tratamiento con fenol.— En los cuatro casos (Tabla 16) el análisis de estas fases

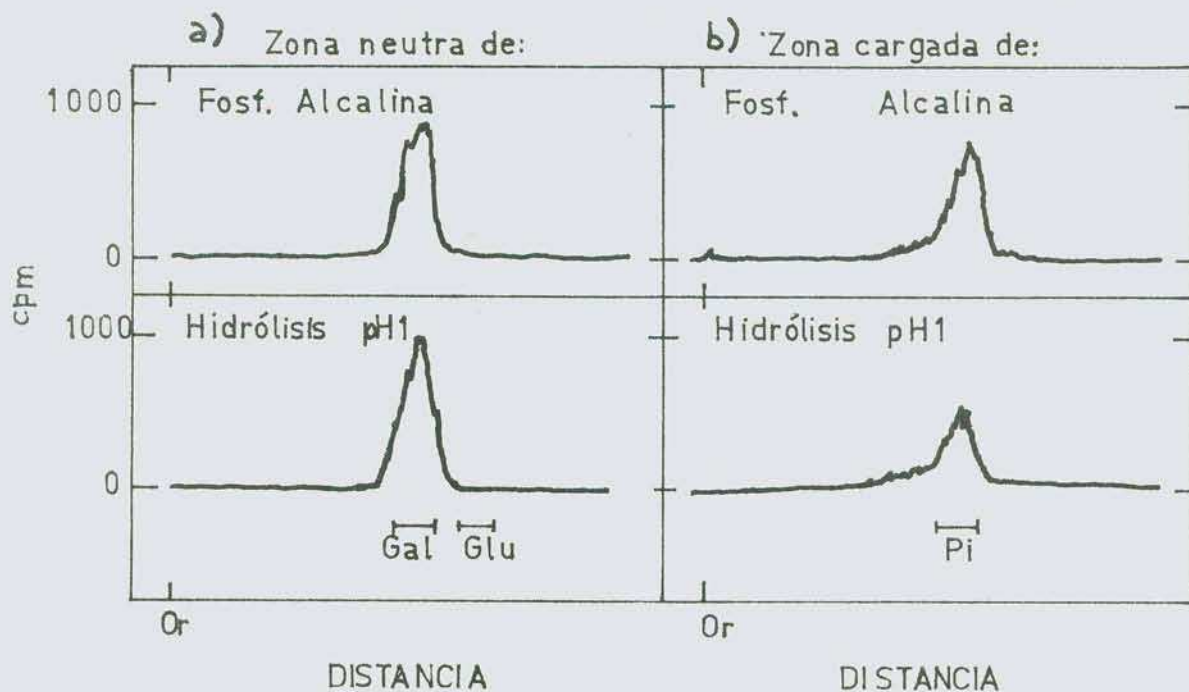


Figura 37: Cromatografía en papel de las zonas neutras (Solvente H) y cargadas (Solvente G) provenientes de la degradación a pH 1 o con fosfatasa alcalina, de la hexosa fosfato doblemente marcada. (Figura 36)

demostró que se trataba de productos sin degradar. En la Figura 38 se muestran cromatografías en papel en Solventes E y J: los perfiles son prácticamente idénticos a los obtenidos con material sin tratar (Figura 34) para el caso del Solvente E. Similares resultados se obtuvieron con el Solvente J.

A diferencia del Solvente E, el Solvente J no degrada al  $\text{FM}^{32}\text{P}$  y lo separa perfectamente del derivado galactosilado. Como se lo diseñó en los últimos meses de este trabajo no pudo ser utilizado en todos los casos.



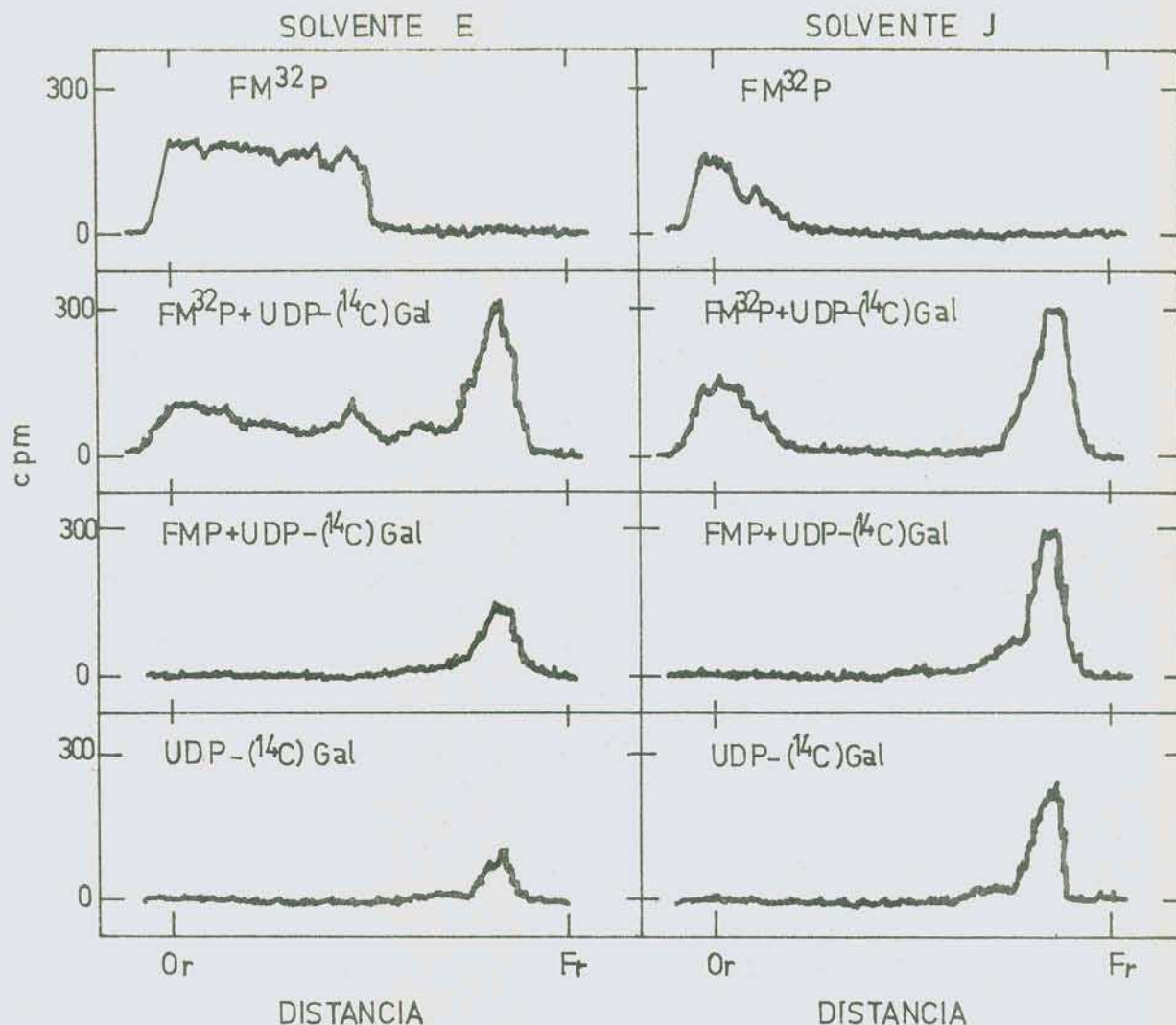


Figura 38: Cromatografía en papel con Solventes E y J de las fases orgánicas provenientes del tratamiento con fenol, Tabla 16 (Experimento con doble marca).

Se confirmó que el  $\text{FM}^{32}\text{P}$ , recuperado de la fase fenólica, estaba intacto, utilizándolo como aceptor exógeno en una incubación análoga a las vistas: en presencia y en ausencia de  $\text{UDP}-(^{14}\text{C})\text{-Gal}$ . Se reprodujeron los resultados arriba descritos. En otras palabras,

ni la incubación ni el tratamiento fenólico alteran la capacidad aceptora del FMP que pueda permanecer en la fase fenólica.

Por otra parte se confirmó también que es el Solvente E y no la incubación la que destruye gran parte del  $\text{FM}^{32}\text{P}$  liberando Pi: tanto el producto de la incubación con  $\text{FM}^{32}\text{P}$  solo, como el doblemente marcado migran con el frente del Solvente F (Figura 39). En este sistema el Pi queda en el origen.

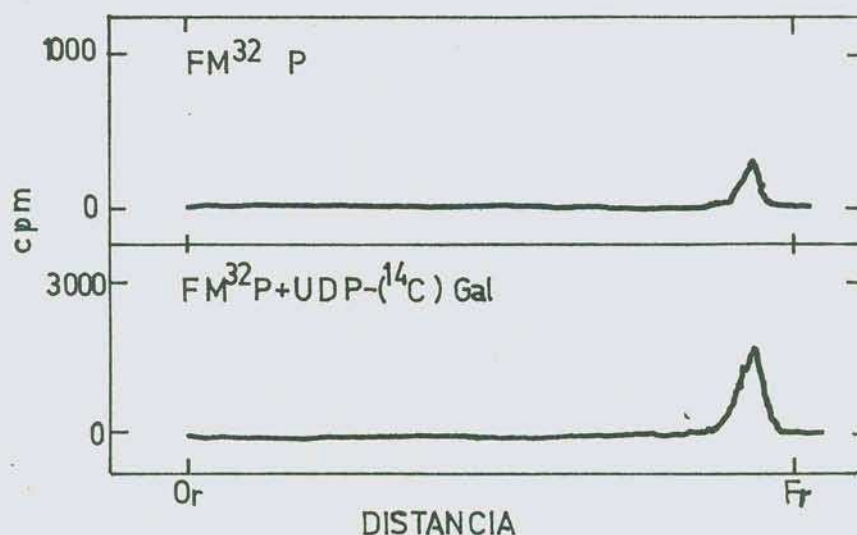


Figura 39: Cromatografía en papel con Solvente F de la fase orgánica del tratamiento fenólico (Tabla 16) para los productos que se señalan en la Figura.

# Extracción del aceptor de *Acetobacter xylinum*

Como material de partida para aislar el aceptor se utilizó tanto la cepa de *A. xylinum* B42 como la 8747.

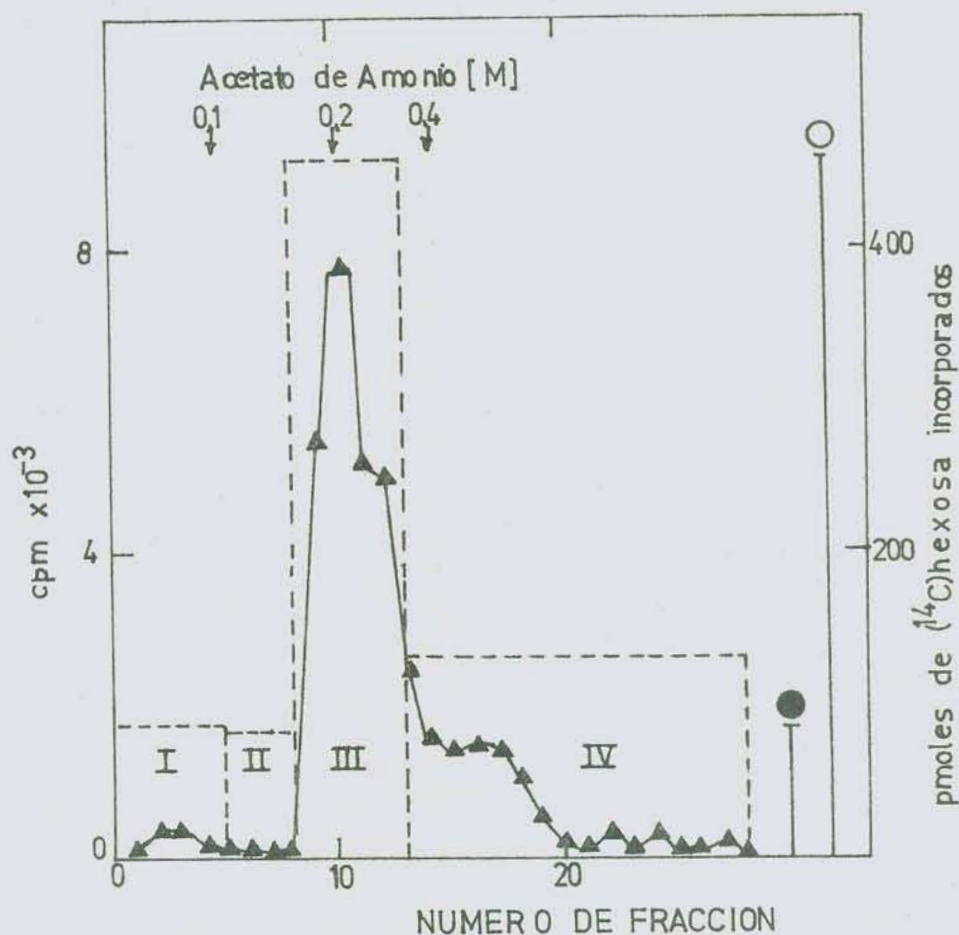


Figura 40: Cromatografía en columna de DEAE-celulosa del extracto butanólico de *A. xylinum* B42 y de FM<sup>32</sup>P. La capacidad aceptora de las 4 fracciones en que se dividieron los eluidos de la columna de DEAE chica (FI, II, III y IV) se dosó como se indica en Materiales y Métodos. La incubación tipo contenía: 0.6% de Triton X-100, 0.62 nmoles de UDP-(<sup>14</sup>C)Gal (92.7 uCi/umol) y enzima P<sub>30</sub> (64.5 ug protefna). Las barras indican la cantidad de (<sup>14</sup>C)hexosa incorporada con cada fracción. Controles: (<sup>14</sup>C)hexosa incorporada en ausencia de eluidos de la columna pero en presencia de Triton X-100 (●) o de Triton X-100 y de 2.5 nmoles de FNP no radioactivo (○). (▲—▲) FM<sup>32</sup>P.

El procedimiento se describe en Materiales y Métodos. Los extractos lipídicos crudos, se purificaron parcialmente por cromatografía en columnas de DEAE-celulosa chicas, y las distintas fracciones se dosaron midiendo su capacidad para estimular la síntesis del Lípido-P-Gal. En la Figura 40 aparece el perfil obtenido con extracto lipídico de la cepa B42 cromatografiado junto con una alícuota de FM<sup>32</sup>P. Se observa que la mayor capacidad estimulante del extracto co-eluyó con el ficaprenil fosfato radioactivo.

Idéntico perfil cromatográfico se obtuvo con extractos lipídicos de la cepa 8747, que no sintetiza zooglea ni celulosa.

Para conocer la cantidad de aceptor endógeno presente en las células se siguieron dos métodos:

En el método a), con enzima P<sub>30</sub> de *A. xylinum* B42, se dosaron extractos (Fracción III de la columna de DEAE-celulosa) obtenidos de cepas B42 y 8747.

En el método b) se midió la capacidad endógena aceptora de galactosa presente en enzima P<sub>30</sub> preparada con ambas cepas. En ambos métodos se usaron concentraciones saturantes de UDP-(<sup>14</sup>C)-Gal. Aunque el rango de variación es muy grande, los resultados (Tabla 17) revelan que la cepa B42 posee aproximadamente el doble de lípido-fosfato aceptor que la 8747. En esta última por otra parte, no se ha detectado actividad de galactosil transferasa. Para la cepa B42 los análisis obtenidos con los dos métodos fueron razonablemente coincidentes aunque los datos obtenidos con el método a) fueron sistemáticamente mayores.



Tabla 17: Dosaje de lípido aceptor de *Acetobacter xylinum*.

Cepa de <i>A. xylinum</i> empleada	Incorporación de $^{14}\text{C}$ galactosa dosada como:	
	Lípido-P-exógeno	Lípido-P-endógeno
	<sup>a</sup> (Fracción III)	<sup>b</sup> (Enzima $\text{P}_{30}$ )
	<u>nmoles de aceptor lípidico</u> <u>gramo de células húmedas</u>	
B42 (sintetiza celulosa)	26 - 40	16 - 30
3747 (no sintetiza celulosa)	9.1 - 20	0

a) El dosaje se efectuó utilizando 32.4 nmoles de UDP-( $^{14}\text{C}$ )-Gal (11.5 uCi/umol), 0.6% de Tritón X-100, enzima  $\text{P}_{30}$  cepa B42 y 1/100 de la F III de cada cepa e incubando 120 minutos a 30°C. En ambos casos las cifras están corregidas por la contribución de aceptor endógeno. b) El dosaje se hizo como en (a) pero sin el agregado de fracción III. La fracción  $\text{P}_{30}$  de la cepa 3747 contenía 105 ug de proteína).

Al purificar los extractos de ambas cepas mediante cromatografía en columnas de DEAE-celulosa, se obtuvo una gran cantidad de sustancia en la fracción neutra (II). Se intentó entonces realizar una extracción en dos etapas con el objeto de separar del extracto crudo los lípidos neutros. Para ello se extrajo primero con acetona y luego con butanol. Los dos extractos se purificaron por cromatografía en columnas de DEAE-celulosa, y se dosó capacidad aceptora en todas las fracciones. En ambos casos se obtuvieron perfiles similares a los de la Figura 40, es decir la fracción con capacidad estimulante fue también la III.

Con la fracción III del extracto acetónico y la FIII del butanólico se realizaron incubaciones en paralelo para ver cual de ellas estimulaba más la síntesis de Lípido-P-Gal. Los resultados (Tabla 18) indican que la fracción cetónica es la más activa, por lo tanto en lo sucesivo se extrajo en una sola etapa y directamente con butanol (o cloroformo-metanol 2:1).

Tabla 18: Capacidad estimulante de la síntesis de Lípido-P-Gal de los lípidos obtenidos por extracción primero con acetona y luego con butanol.

Condiciones de incubación	pmoles ( $^{14}\text{C}$ )hexosa/mg de proteína
+Triton X-100	62.7
+Triton X-100 + FIII acetona	435.0
+Triton X-100 + FIII butanol	115.3

Se incubó en las condiciones tipo con 0.6% de Triton X-100, 0.65 nmoles de UDP( $^{14}\text{C}$ )Gal (86.1 uCi/umol). Se usó como enzima la fracción  $S_{48}$  (144 ug de proteína). De ambas fracciones se usaron cantidades comparables: 1/100 de la FIII.

Como la presencia de un fosfato unido a un alcohol alílico en el aceptor endógeno de *A. xylinum* ya ha sido señalada (68), se trató de confirmar si el aceptor detectado en el extracto lipídico purificado por columna tenía las propiedades esperables en ese tipo de unión. El criterio seguido consistió en ver si por hidrólisis ácida perdía su capacidad estimulante. Para ello se lo trató a pH2 en paralelo con una muestra de FMP. En estas condiciones ambos productos perdieron la capacidad

aceptora aun en presencia de cantidades saturantes de UDP-Gal (Tabla 19). Como se observa en la Tabla en estas condiciones los compuestos  $\alpha$ -saturados (DolMP) no son afectados.

Tabla 19: Hidrólisis a pH2, de la Fracción III, FMP y DolMP.

Condiciones de incubación	pmoles de ( $^{14}\text{C}$ )hexosa/mg proteína
+Triton X-100	1447
+Triton X-100 + FIII sin hidrolizar	8336
+Triton X-100 + FIII hidrolizado	1400
+Triton X-100 + FMP sin hidrolizar	4503
+Triton X-100 + FMP hidrolizado	1440
+Triton X-100 + DolMP sin hidrolizar	3874
+Triton X-100 + DolMP hidrolizado	3450

Se incubó 90 minutos en las condiciones tipo con 0.6% de Triton X-100 19.3 nmoles de UDP-( $^{14}\text{C}$ )-Gal (11.3 uCi/umol) y, donde se indica, 0.4 nmoles de FMP, 1/100 de FIII y una cantidad no determinada de DolMP.

Análisis de extractos lipídicos de A. xylinum por espectrografía de masa.

Con este objeto se utilizaron dos tipos de materiales:

- La fracción III se hidrolizó a pH2, se extrajo con éter de petróleo y analizó la fracción etérea.
- El extracto etéreo mencionado en a) se volvió a fraccionar por cromatografía en columna de DEAE-celulosa y se analizó la fracción neutra.

Los resultados obtenidos con ambos materiales (Figura 41) muestran picos de masa específica (m/e) 766 y 748 que corresponden al undecaprenol y a su producto de deshidratación así como otros picos: 698 y 680, que corresponden al decaprenol y su producto de



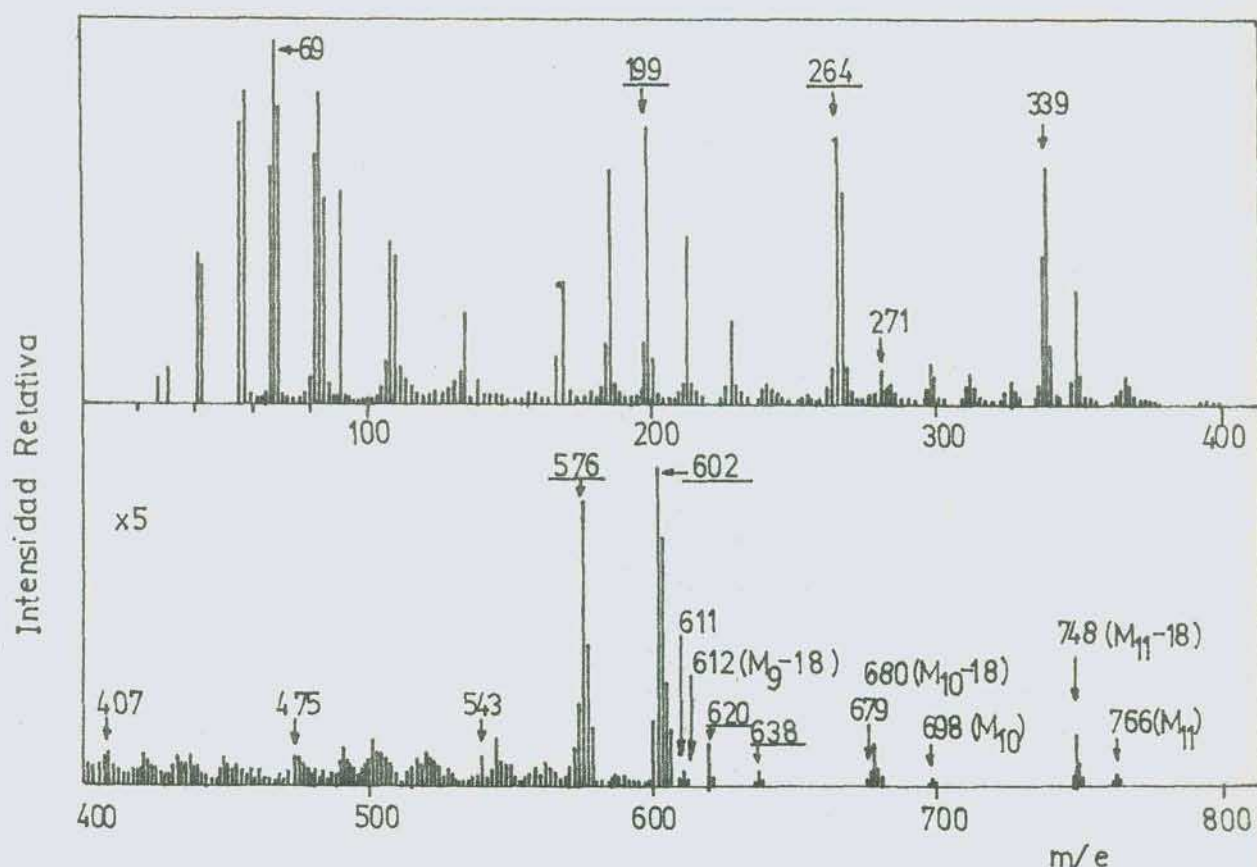


Figura 41: Espectro de masa de los extractos lipídicos de la cepa de *Acetobacter xylinum* B42.

de deshidratación; y, posiblemente, también un pico de masa 612 correspondiente al nonaprenol menos agua. Estos datos, unidos al hecho de que el ión más abundante posee masa 69 y que grupos de picos difieren en masa 68 (679, 611, 543, 475 etc.) revelan la presencia de una familia de poliprenoles de 9-11 unidades de isopreno.

Se observan además otros picos de gran intensidad (602, 576, 264, 199) que aunque no encajan en el esquema de ruptura del undecaprenol probablemente corresponden también a otro compuesto de naturaleza poliprenólica. La intensidad relativa de estos picos con respecto a los derivados del undecaprenol, varió en cada preparación analizada.



Activación por otros extractos lipídicos.

Aparte del FMP y del extracto lipídico de *Acetobacter xylinum*, se efectuaron ensayos de estimulación de la síntesis de Lípido-P-Gal con extractos lipídicos de: arveja, soja, insecto e hígado de cerdo. La Tabla 20 muestra una experiencia realizada con cada uno de ellos. Se observa que en las condiciones

Tabla 20: Estímulo en la síntesis de Lípido-P-Gal con diferentes extractos lipídicos.

Condiciones de incubación	( <sup>14</sup> C) hexosa liposoluble (cpm)
+Triton X-100	23.000
+Triton X-100 y FMP	146.960
+Triton X-100 y DoIMP de hígado de cerdo	77.367
+Triton X-100 y aceptor de arveja	27.620
+Triton X-100 y aceptor de soja	28.068
+Triton X-100 y aceptor de insecto	19.618

La mezcla de incubación tipo contenía 0.78 nmoles de UDP-(<sup>14</sup>C)-Gal (268 uCi/umol), 0.6% de Triton X-100 y donde se indica 2.1 nmoles de FMP, 2.0 nmoles de DoIMP y cantidades de extractos lipídicos de arveja, soja e insecto capaces de estimular los sistemas que se indican en la Tabla 21. Se incubó durante 30 minutos a 30°C.

del ensayo solo el DoIMP de hígado de cerdo estimuló la síntesis de Lípido-P-Gal. Se debe señalar que cada uno de los extractos utilizados estimuló la síntesis de los lípido-fosfo-azúcares que se indican en la Tabla 21.

Tabla 21: Extractos lipídicos usados y sistemas que estimulan.

Extracto aislado de:	Sistema enzimático usado	Producto estimulado	Referencia
Insecto	Insecto	Lípido-P-Man	(98)
Arveja	Arveja	Lípido-P-Glu	
Soja	Hígado de rata	DolMP-Glu	
Hígado de cerdo	Hígado de rata	DolMP-Glu	(30)

Debido a estos resultados y sin optimizar condiciones para los demás extractos se continuó trabajando solo con el DolMP de hígado

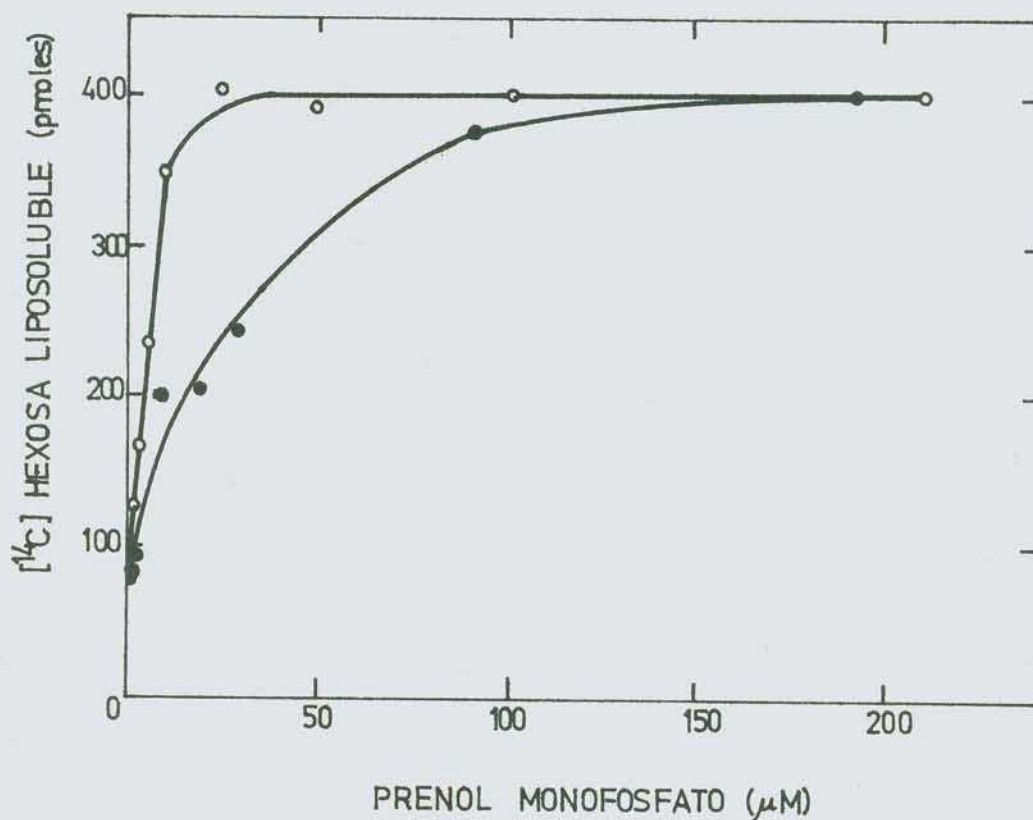


Figura 42: Efecto de la concentración de prenilmonofosfato. La mezcla tipo contenía: 0.62 nmoles de UDP-( $^{14}\text{C}$ )-Gal (134 uCi/umol), enzima  $\text{P}_{30}$  (64.5 ug proteína), 0.6% de Triton X-100 y las cantidades de FMP (○) y DolMP (●) que se indican.

de cerdo. La Figura 42 muestra el efecto de la concentración de DolMP y FMP sobre la síntesis de Lípido-P-Gal. Como se observa al parecer el DolMP a bajas concentraciones estimula menos que el FMP la síntesis del lípido-azúcar.

Con los productos obtenidos, sin adiciones y en presencia de FMP y DolMP se efectuó el tratamiento fenólico cuyos resultados se indican en la Tabla 22. Se observa una analogía entre el FMP-Gal y el Lípido-P-Gal obtenido con el aceptor endógeno, ya que ambos fueron cuantitativamente degradados; en cambio, el DolMP-Gal resultó resistente al fenol en estas condiciones. Análogos resultados se obtuvieron por reducción catalítica con  $H_2$  (Tabla 14). La diferencia de comportamiento entre los compuestos formados por un lípido  $\alpha$ -insaturado (ficaprenol), de los formados por un lípido  $\alpha$ -saturado (dolicol) parece ser una herramienta útil para distinguir ambos tipos de sustancias.

Tabla 22: Tratamiento fenólico.

Compuesto	Fase fenólica (cpm)	Fase acuosa (cpm)	Ruptura (%)
Lípido-P-( $^{14}C$ )-Gal (endógeno)	844	3.845	82
FMP-( $^{14}C$ )-Gal	1.045	3.551	77
DolMP-( $^{14}C$ )-Gal	2.738	787	22

El tratamiento se hizo como se señala en Materiales y Métodos durante 3 horas. Las muestras de FMP-( $^{14}C$ )-Gal y DolMP-( $^{14}C$ )-Gal contenían un 15% de Lípido-P-( $^{14}C$ )-Gal endógeno de acuerdo a la cantidad de aceptor endógeno presente en el preparado enzimático usado para su síntesis.



### Estimulación de la formación de Lípido-PP-Glu por el agregado de FMP.

Se ha podido demostrar que el Lípido-PP-Glu es un intermedio en la síntesis de un glucano, soluble en agua, y distinto de la celulosa y del almidón (73). Se intentó ver, en colaboración

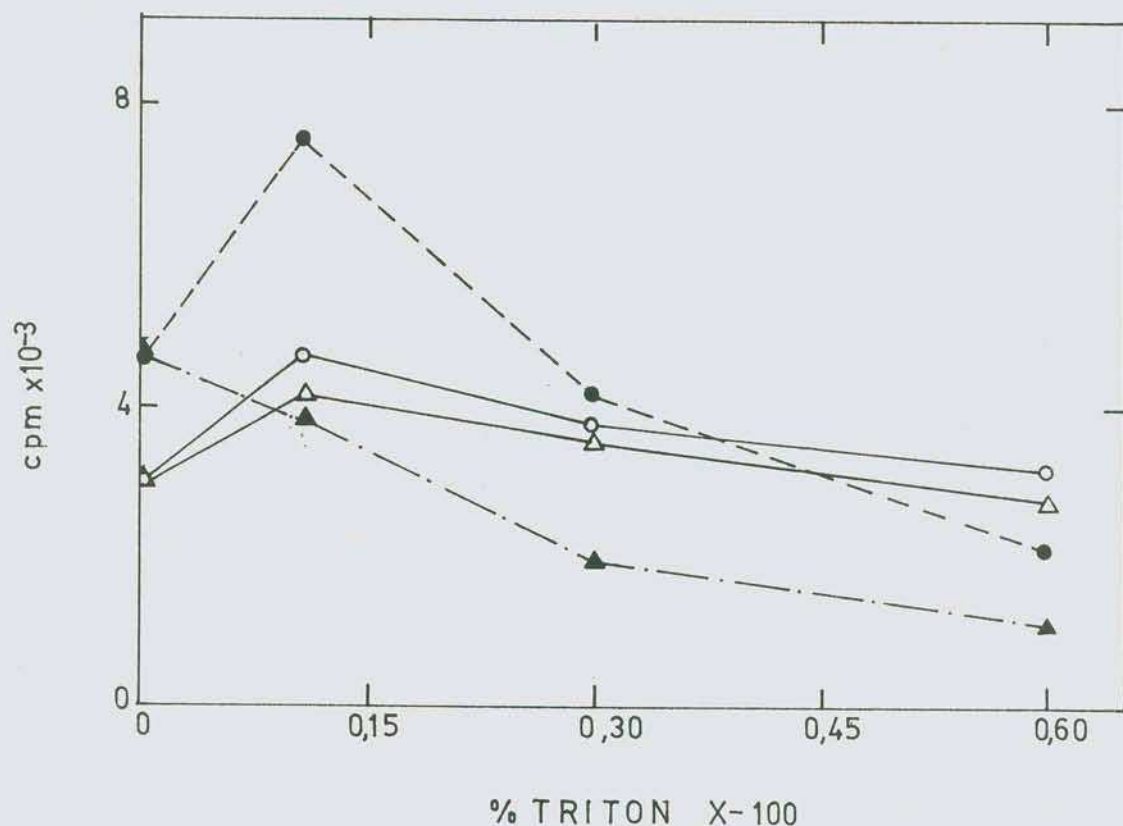


Figura 43: Efecto del Triton X-100 y del FMP sobre la formación de Lípido-PP-Glu y de polímero a 0°C. La mezcla tipo se incubó 60 minutos a 0°C y contenía: 0.58 nmoles de UDP-(<sup>14</sup>C)-Glu (309 uCi/umol), enzima P<sub>30</sub> y las cantidades de FMP y de detergente que se indican. El Lípido-PP-Glu y el polímero se determinaron como se señala en Materiales y Métodos. (▲-.-▲) Lípido-PP-Glu sin FMP, (●-.-●) Lípido-PP-Glu con 0.25 nmoles de FMP, (Δ—Δ) polímero sin FMP y (○—○) polímero con 0.25 nmoles de FMP.

con R.C. García, si por el agregado de FMP exógeno se lograba estimular la síntesis del glucano o del intermedio o de ambos.



En las condiciones empleadas inicialmente (Incorporación a partir de UDP-Glu) los detergentes inhibían la síntesis del glucano (Figura 16) y solo excepcionalmente se observó la formación de Lípido-PP-Glu en presencia de Triton X-100 y de FMP (Figura 15). Todos estos estudios se llevaron a cabo incubando a 30°C. Teniendo en cuenta que, en ausencia de detergentes, la formación de Lípido-PP-Glu es óptima a 0°C (73) se retomó esta investigación trabajando a bajas temperaturas.

El efecto de cantidades crecientes de Triton X-100 sobre incubaciones a 0°C se muestra en la Figura 43. En estas condiciones el detergente continua inhibiendo la formación de Lípido-PP-Glu pero este efecto es no solo revertido por el agregado de FMP sino que a una concentración de 0.12% de Triton X-100 se observa estimulación. La síntesis de polímero no fué tan afectada, pero en términos generales en presencia de FMP y detergente, especialmente a bajas concentraciones de este último, se observó un ligero estímulo.

Utilizando la concentración óptima de detergente (0.12%) se investigó el efecto de la concentración de UDP-Glu (Figura 44). Sin adiciones o en presencia de Triton X-100 a una concentración 30  $\mu$ M de UDP-Glu se llega a una meseta. En presencia de Triton X-100 y FMP se observan estimulaciones del orden del 100%, y además no se llegó a una meseta sino que aun a concentraciones mayores de 30  $\mu$ M UDP-Glu se observó un gradual incremento de la incorporación.

La síntesis de polímero a esta temperatura es muy pequeña, pero también fué estimulada tanto por la adición de Triton X-100 solo,

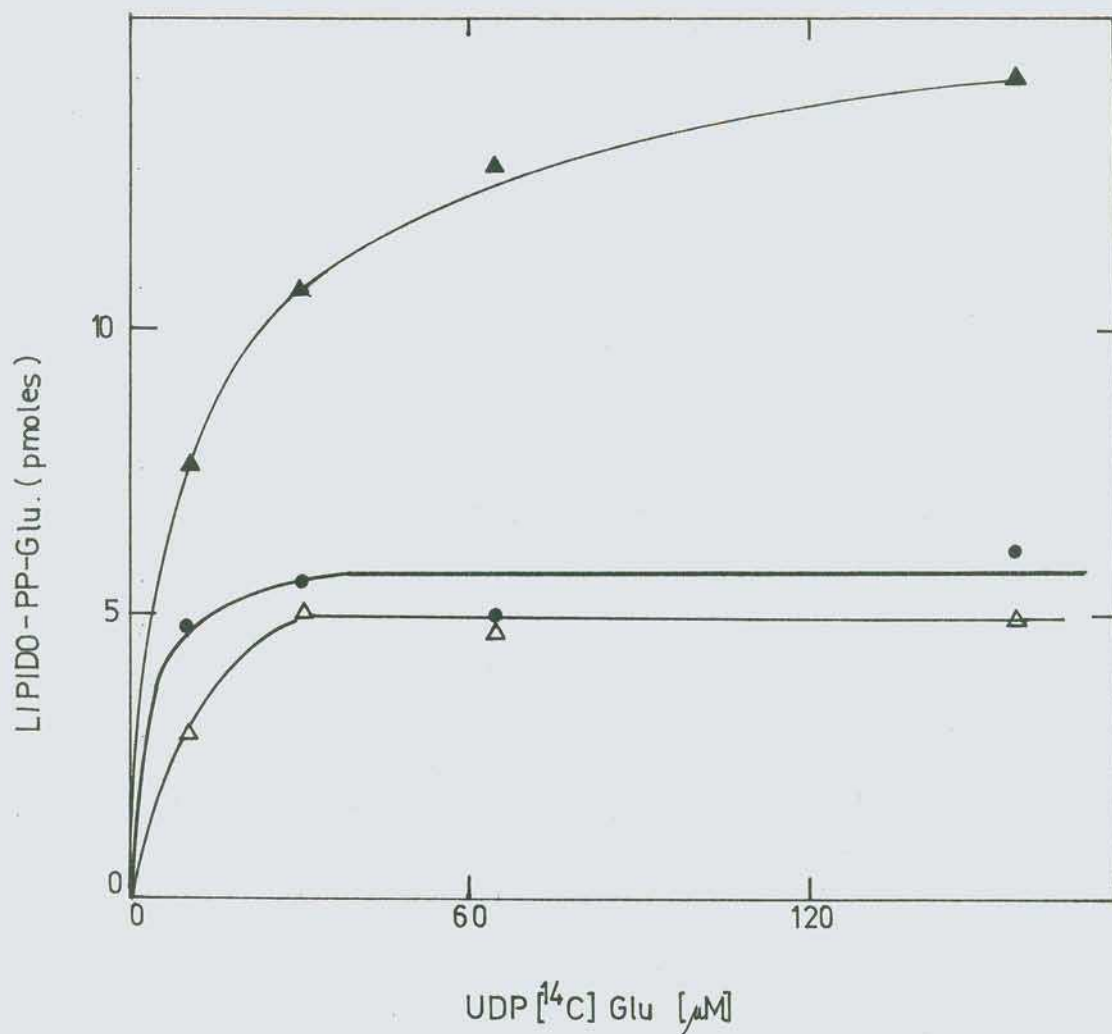


Figura 44: Efecto de la concentración de UDP-Glu sobre la formación del Lípido-PP-Glu. Se incubó a 0°C, 60 minutos con enzima P<sub>30</sub> y las cantidades de UDP-(<sup>14</sup>C)-Glu que se indican, (●—●) sin adiciones; (Δ—Δ) con Triton X-100, 0.12%; (▲—▲) con Triton X-100 0.12% y 2.2 nmoles de FMP.

como por la de FMP y detergente. Los incrementos observados fueron menores (20-50%).

Análisis de producto.

El material liposoluble obtenido en presencia de FMP y detergente se identificó como Lípido-PP-Glu. Por cromatografía en columna de DEAE-celulosa se obtuvo el perfil que se indica en la Figura 45. Parte de dicho material cromatografiado en papel se

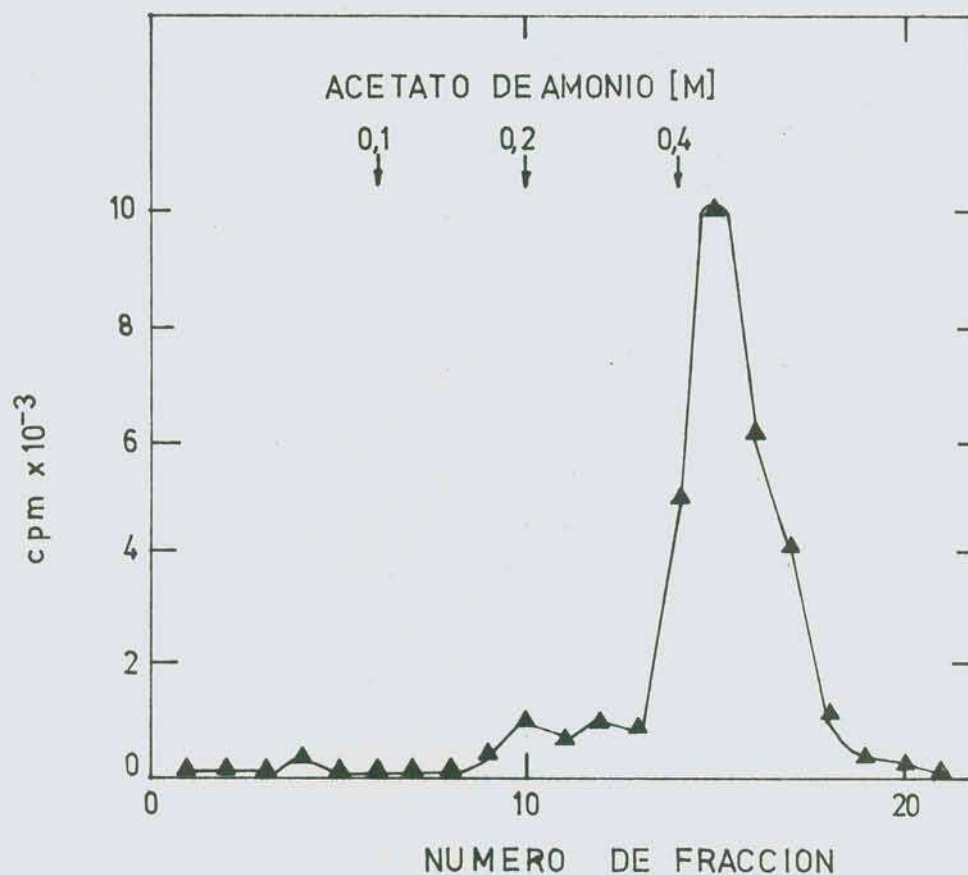


Figura 45: Cromatografía en columna de DEAE-celulosa del material soluble en butanol obtenido en presencia de FMP exógeno. La mezcla tipo contenía: 10 nmoles de UDP-(<sup>14</sup>C)-Glu (107.2 uCi/umol), 7 nmoles de FMP, 0.09% de Triton X-100 y enzima P<sub>30</sub> (200 ug de proteína). Se incubó a 15°C durante 60 minutos. La columna (0,8 X 31 cm) fué desarrollada como se indica en Materiales y Métodos.

movió con el frente del Solvente F y en Solvente E produjo el éster cíclico de la glucosa 1,2 fosfato. Por hidrólisis ácida suave (pH 2, 100°C, 10 minutos) se degradó en un 84% liberando  $^{14}\text{C}$  glucosa. Tratado con fenol (50% fenol, 10 minutos, 68-70°C) un 89% de la radioactividad pasó a la fase acuosa; dicho material por electroforesis en acetato de piridinio migró con la movilidad de glucosa pirofosfato (68).

La demostración de que el FMP es sustrato y no un activador de la reacción de síntesis de Lípido-PP-Glu, se llevó a cabo en forma análoga a la utilizada en el caso del Lípido-P-Gal. Se realizó un experimento similar a los descritos pero usando doble marcación: FM- $^{32}\text{P}$  y UDP-( $^{14}\text{C}$ )-Glu.

El exceso de FM- $^{32}\text{P}$  se separó del F- $^{32}\text{P}$ -( $^{14}\text{C}$ )-Glu formado por cromatografía en columna de DLAE-celulosa (Figura 46).

A una concentración de acetato de amonio 0.2 M eluye solamente el FM- $^{32}\text{P}$ , en cambio después de incrementar la concentración a 0.4 M aparece material con doble marcación en la zona en que, en columnas control, eluye el Lípido-PP-Glu formado con aceptor endógeno. La identidad del compuesto con doble marca (fracciones 15-16) se estableció por tratamiento con fenol. Un 94% de la radioactividad se transfirió a la fase acuosa. Este material, que contenía  $^{14}\text{C}$  y  $^{32}\text{P}$ , por electroforesis en acetato de piridinio migró con la movilidad de glucosa pirofosfato.



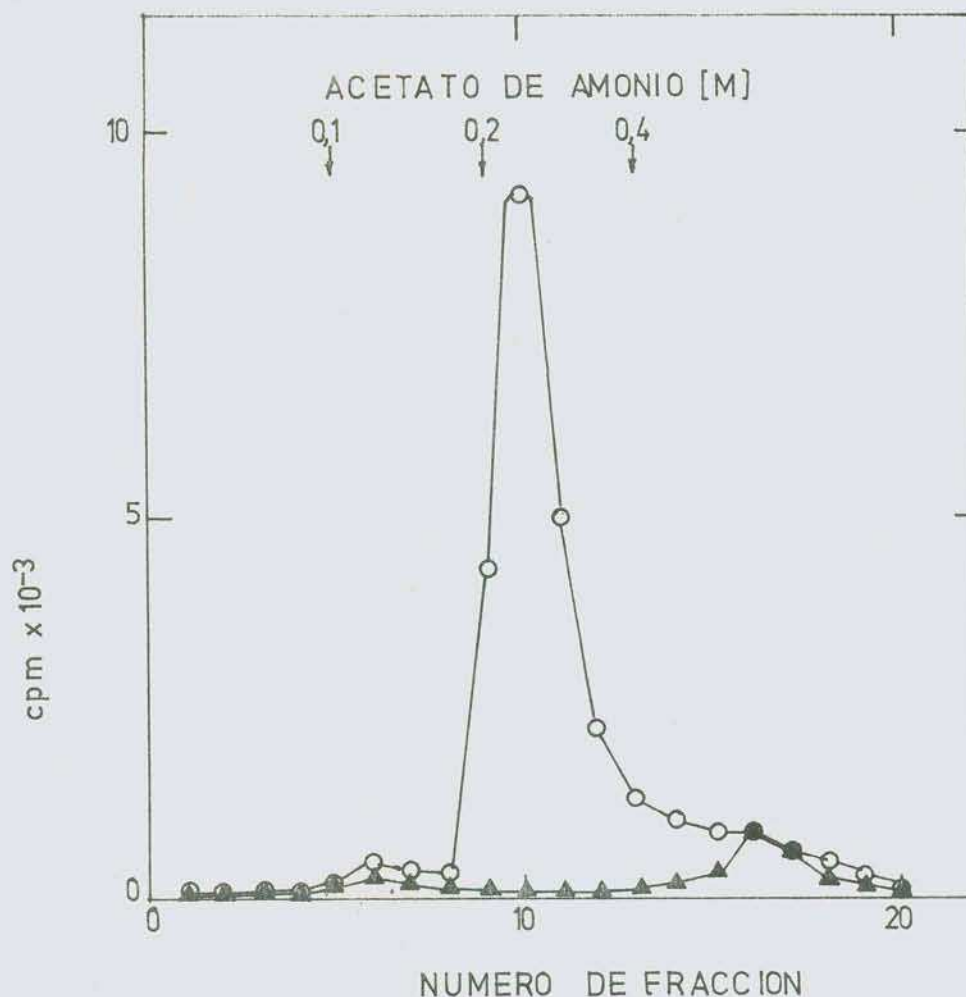


Figura 46: Cromatografía en columna de DEAE-celulosa de material liposoluble obtenido con doble marcación. La mezcla tipo que contenía 10.7 nmoles de UDP- $(^{14}\text{C})$ -Glu, 0.63 nmoles de FM $^{32}\text{P}$ , 0.12% de Triton X-100 y enzima  $\text{P}_{30}$  se incubó a  $0^\circ\text{C}$ , 120 minutos. La columna (5 x 40 mm) se lavó con 1 ml de metanol 99%. Luego se eluyó en forma discontinua usando concentraciones crecientes de acetato de amonio en metanol 99%: 0.1 M (1 ml), 0.2 M (1 ml) y 0.4 M (2 ml). Se colectaron fracciones de 0.3 ml. (○—○)  $^{32}\text{P}$ , (▲—▲)  $^{14}\text{C}$ .

Estimulación de la síntesis de polímero.

Los resultados obtenidos incubando a  $0^\circ\text{C}$  fueron satisfacto-

rios en cuanto a la síntesis de Lípido-PP-Glu, no así para la síntesis del polímero, que a dicha temperatura es muy pequeña. En vista de ello se buscaron otras condiciones.

En la Tabla 23 aparecen los resultados de incubar a 0°, 15°, y 30°C.

Tabla 23: Incorporación de ( $^{14}\text{C}$ ) hexosa a material liposoluble y a polímero a 0°, 15° y 30°C.

	( $^{14}\text{C}$ ) hexosa (pmoles)					
	0°C		15°C		30°C	
Condiciones de incubación	Butanol	Polímero	Butanol	Polímero	Butanol	Polímero
sin adiciones	11	2	18	11	16	92
+Triton X-100	-	-	10	15	6	19
+Triton X-100 y FMP	22	3	39	21	10	21

La mezcla tipo se incubó durante 30 minutos a las temperaturas indicadas. Contenía 0.6 nmoles de UDP- $(^{14}\text{C})$ -Glu (309 uCi/umol); enzima P<sub>30</sub> y, cuando se indica, 0.09% de Triton X-100 y 1.8 nmoles de FMP. Se inactivó y procesó como se indica en Materiales y Métodos.

Se observa que sin adiciones la cantidad de polímero formado es directamente proporcional a la temperatura. Se ve también que el efecto inhibitorio del detergente es máximo a 30°C, y que a 0° y 15°C el estímulo por FMP es mayor sobre el material butanólico que sobre el polímero, y nulo a 30°C. No obstante, a 15°C se observó un incremento discreto en la cantidad de polímero formado.

Se investigó entonces el efecto de la concentración de FMP a esta temperatura (Figura 47): a mayor cantidad de FMP aumentó la cantidad de Lípido-PP-Glu sintetizado (el material liposoluble se caracterizó como Lípido-PP-Glu por los métodos ya vistos) y también aumentó, aunque en menor proporción, la síntesis del polímero. Duplicando la cantidad de UDP-( $^{14}$ C)-Glu se obtuvieron estímulos mucho mayores (Tabla 24) para el polímero.

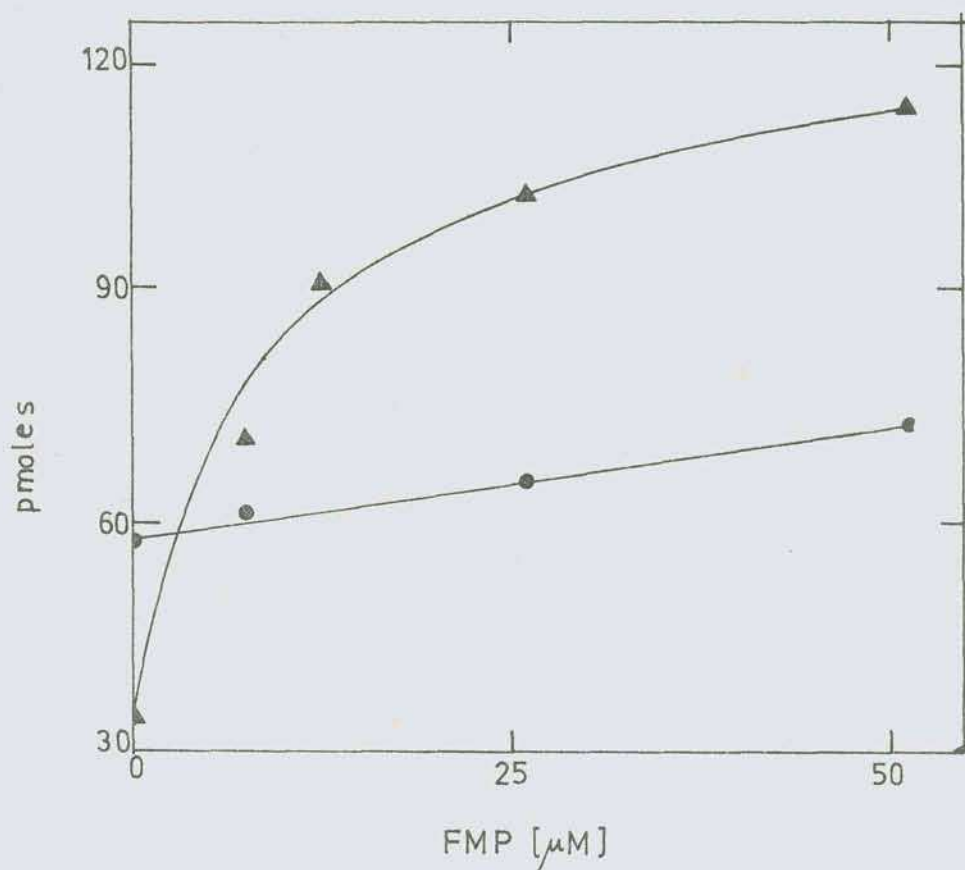


Figura 47: Efecto de FMP sobre la formación de material liposoluble y de polímero, a 15°C. La mezcla tipo que contenía 0.6 nmoles de UDP-( $^{14}$ C)-Glu (309 uCi/umol), 0.09% de Triton X-100, enzima P<sub>30</sub> y las cantidades de FMP indicadas, se incubó a 15°C durante 60 minutos. (▲—▲) material liposoluble, (●—●) polímero.

Tabla 24: Incorporación de ( $^{14}\text{C}$ ) hexosa a Lípido-PP-Glu y a polímero.

Condiciones de incubación	( $^{14}\text{C}$ ) hexosa incorporada (pmoles/mg de proteína)	
	Lípido-PP-Glu	Polímero
Sin adiciones	187	335
+Triton X-100	209	781
+Triton X-100	355	1414

La mezcla tipo se incubó 60 minutos a  $15^{\circ}\text{C}$ , con 1.29 nmoles de UDP-( $^{14}\text{C}$ )-Glu (268 uCi/umol), enzima  $\text{P}_{30}$  (200 ug proteína) y, cuando se indica 0.09% de Triton X-100 y 3.6 nmoles de FMP (51.4  $\mu\text{M}$ ). El Lípido-PP-Glu y el polímero se determinaron como se indica en Materiales y Métodos.

Los resultados arriba descritos fueron todos obtenidos con fragmentos celulares (enzima  $\text{P}_{30}$ ). En esas condiciones, en presencia de FMP y Triton X-100, no se observó la formación de lípido difosfato celobiosa (Lípido-PP-Cel), otro de los lípido-azúcares caracterizados en este organismo (68).

Se emplearon entonces células enteras tratadas con EDTA, y las incubaciones se llevaron a cabo a  $15^{\circ}\text{C}$ , pues en esas condiciones se pueden detectar todos los componentes del sistema (García y Dankert en preparación) (Tabla 25). En presencia de Triton X-100 y FMP los cuatro compuestos se incrementaron discretamente, aunque el Lípido-P-Gal y el Lípido-PP-Glu aumentan por el solo efecto de detergente. No obstante parece claro que el FMP también estimula la formación de Lípido-PP-Cel. Este sistema posiblemente ofrezca las mejores posibilidades para observar incrementos mayores.



Tabla 25: Incorporación de ( $^{14}\text{C}$ ) hexosa a material soluble en butanol y al polímero con células tratadas con EDTA.

Condiciones de incubación	( $^{14}\text{C}$ ) hexosa (pmoles)			
	Lípido-P-Gal	Lípido-PP-Glu	Lípido-PP-Cel	Polímero
sin adiciones	7.3	1.8	3.5	47.9
+Triton X-100	10.2	3.5	3.3	42.6
+Triton X-100 y FMP	13.1	3.6	5.7	58.3

La mezcla tipo se incubó 60 minutos a  $15^{\circ}\text{C}$  con 0.65 nmoles de UDP-( $^{14}\text{C}$ )-Glu (268 uCi/umol); 0.09% de Triton X-100, 4.5 nmoles de FMP y enzima (células tratadas con EDTA 860 ug proteína). El polímero y el material liposoluble se analizaron como se señala en Materiales y Métodos.

### Aceptores de Galactosa

El preñol monofosfato galactosa descrito en apartados anteriores tiene todas las propiedades de un dador de galactosa. No obstante los experimentos efectuados para confirmar tal función no han tenido éxito.

También se intentó buscar algún polisacárido que contuviera galactosa, pensando que podría ser el acceptor final de este azúcar. Esta tarea tampoco tuvo éxito pero el trabajo realizado condujo a la aislación de por lo menos 4 compuestos cuya composición cualitativa se pudo establecer en parte.

El estudio del material celulósico obtenido al disgregar las zoogreas (Materiales y Métodos) indicó que más de un 98% de su peso seco era insoluble en álcali y por lo tanto, presumiblemente, celulosa.

El sobrenadante obtenido al centrifugar las células se utilizó entonces como fuente de polisacáridos, obteniéndose finalmente una cierta cantidad de material que se liofilizó (\*) (ver aislación de polisacáridos en Materiales y Métodos). La Figura 48 muestra una cromatografía en columna de DEAE-celulosa de dicho material. Se observan 3 picos principales: uno neutro (pico  $\alpha$ ) y dos de carácter aniónico ( $\beta$  y  $\gamma$ ).

(\*) El material liofilizado contenía aproximadamente un 30% de proteína. Tratamiento con fenol (50% fenol, 74-78°C, 1 hora con agitación) redujo esta cantidad a un 5%.

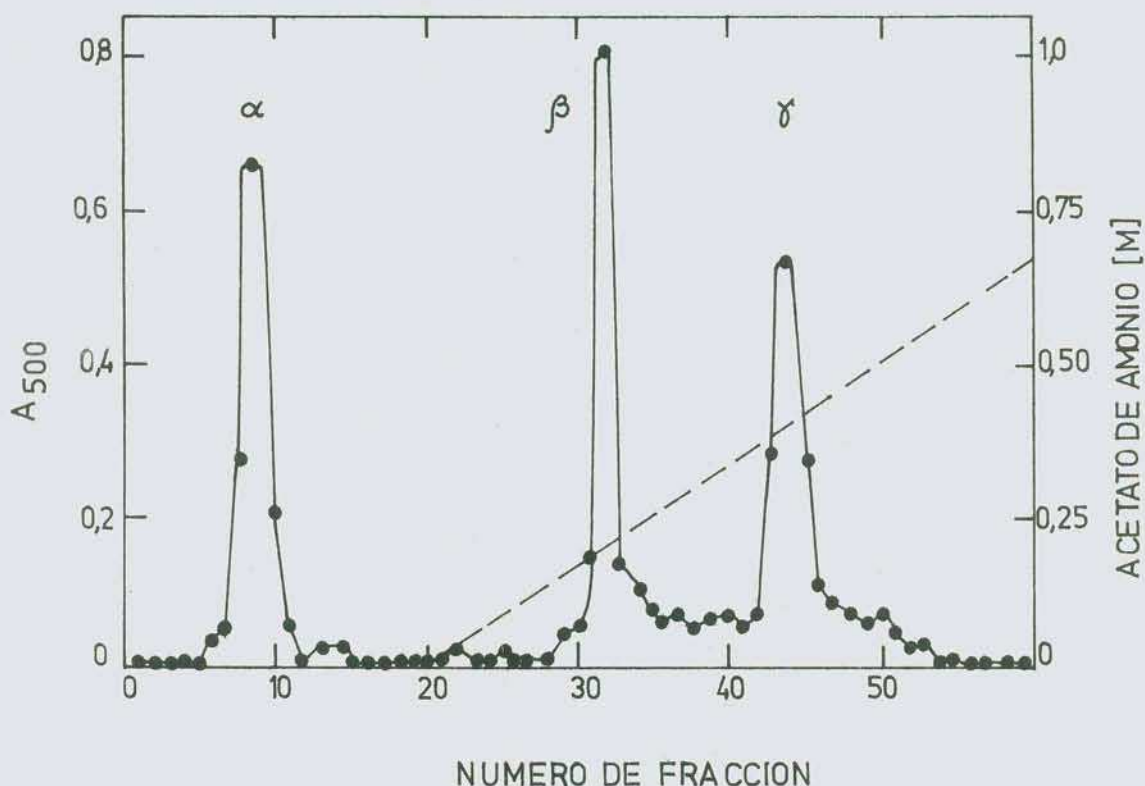


Figura 48: Cromatografía en columna de DEAE-celulosa de polisacáridos producidos por *Acetobacter xylinum* B42. Se usaron 90 mg del producto liofilizado. La columna se desarrolló como se indica en Materiales y Métodos. Los azúcares se dosaron por el método del fenol-sulfúrico.

Pico  $\alpha$ . Se hizo una hidrólisis total en presencia de resina Dowex 50. Por cromatografía en papel con Solvente H se observaron 3 componentes con la movilidad de manosa, glucosa y vestigios de ramnosa. La identidad de la manosa, el azúcar aparentemente más abundante, se confirmó por cromatografía en papel en Solvente K. Este solvente discrimina manosa, de fructosa y de arabinosa, que en Solvente H tienen prácticamente el mismo  $R_f$ .

Sospechando la presencia de un manano se intentó precipitarlo con  $\text{Cu}^{++}$ . Se utilizó la técnica de Algranati y col (211) y tanto el material precipitado ( $\alpha_1$ ) como el sobrenadante ( $\alpha_2$ ) se

hidrolizaron en presencia de Dowex 50. Por cromatografía en Solvente H, el material proveniente del precipitado ( $\alpha_1$ ) permitió observar los 3 azúcares, en tanto que en el sobrenadante ( $\alpha_2$ ) solo se detectó glucosa y vestigios de manosa. Análogos resultados se obtuvieron con material sin fraccionar por columna de DEAE-celulosa. En este último caso el sobrenadante ( $\alpha_2$ ) de la precipitación con  $\text{Cu}^{++}$  se dializó en medio ácido (pH=1) y luego en medio neutro. Se trató con  $\alpha$ -amilasa, pero no se observó degradación descartándose así la presencia de glucógeno. Esta fracción  $\alpha$ , entonces, parecería contener por lo menos 2 componentes:  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  Picos  $\beta$  y  $\gamma$ . Con estos picos se hizo también una hidrólisis total en presencia de Dowex 50 pero, antes de analizarlo como en el caso anterior, el producto se sometió a electroforesis en papel para separar compuestos "neutros" de "cargados".

Los primeros resultaron ser manosa y glucosa (en menor cantidad) en el caso del pico  $\beta$ , y glucosa y manosa (en menor cantidad) con vestigios de ramnosa, en el caso del pico  $\gamma$ .

La identidad de la ramnosa, presente en pequeña cantidad, se determinó en un hidrolizado del material sin fraccionar por cromatografía en DEAE-celulosa. Se separó de los azúcares "cargados" por electroforesis en acetato de piridinio y de los neutros por cromatografía en Solvente H. El azúcar que migró como ramnosa, se eluyó, y determinó por el método de Dische en condiciones específicas para dicho monosacárido (200 y 201).

El material "cargado" dió 2 compuestos en electroforésis en acetato de piridinio, con las movilidades de ácido glucurónico y de



ácido galacturónico.

La identidad del primero se confirmó por electroforesis en buffer borato, pues en este sistema el ácido glucurónico se separa del ácido manurónico. En el buffer acetato de piridinio ambos ácidos tienen movilidad idéntica.

La presencia de ácido galacturónico no pudo confirmarse pues el ácido glucónico tiene prácticamente la misma movilidad. Tampoco se pudo descartar la existencia de ácido manurónico pues por electroforesis en buffer borato no se separa prácticamente ni del ácido galacturónico ni del glucónico.

Por cromatografía en papel de DEAE-celulosa (Whatman DE 20) en Solvente G, se logró una buena separación de ácidos urónicos de aldónicos. Lamentablemente los resultados obtenidos con el material "cargado" fueron ambiguos, aunque probablemente solo existan ácidos urónicos. En la Tabla 26 se resumen estos estudios.

Tabla 26: Composición cualitativa de los polisacáridos aislados del sobrenadante obtenido al separar celulosa de células de A. xylinum.

Azúcar	Fracción			
	$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\beta$	$\gamma$
glucosa	+	++	+	++
manosa	++	+	++	+
ramnosa	+	-	-	+
ácidos urónicos	-	-	+	+
ácidos aldónicos	-	-	?	?

### Enzimas relacionadas

Al mencionar el ciclo biosintético del polisacárido O en *Salmonella newington* se hizo referencia a la existencia de ciertas enzimas descritas no en dicho ciclo sino en el de la mureína o pared celular. Específicamente se señaló la existencia de fosfatasas que catalizan las reacciones:



La enzima poliprenil pirofosfato fosfatasa que actúa en la reacción 1 permite que el lípido pirofosfato que se forma al finalizar un ciclo pueda iniciar otro nuevo (Figura 7). Como en la biosíntesis de los poliprenoles estos son liberados como Prenol-PP (17), el espectro de esta enzima debería ser amplio.

La fosfatasa que cataliza la reacción 2 solo ha sido descrita en *S. aureus* (160).

En la introducción a este trabajo se mencionó también la presencia de una quinasa que efectúa la fosforilación del alcohol libre:



Esta reacción podría ser una vía alternativa para la obtención de Prenol-P, aunque hasta el momento solo se ha descrito en *S. aureus* (161).

La presencia de estas enzimas fué someramente analizada en este trabajo, encontrándose indicios de la existencia de las

que catalizan la reacción 1 y la reacción 3.

#### Prenol quinasa

Para investigar la presencia de esta enzima se efectuaron dos incubaciones sucesivas. En la primera de ellas se incubó el preparado enzimático  $P_{30}$  con  $AT^{32}P$  a fin de permitir la formación de Prenil- $^{32}P$  con sustrato endógeno o exógeno (ficaprenol). En la segunda incubación se agregó UDP-Gal, con el objeto de capturar en la forma de Prenil- $^{32}P$ -Gal, al Prenil- $^{32}P$  presumiblemente sintetizado en la primera incubación. Como en los casos anteriores se investigó la presencia de estos compuestos en extractos butanólicos de las mezclas de incubación. Este procedimiento en dos etapas se siguió debido a que el  $^{32}P$  soluble en butanol obtenido en la primera incubación era heterogéneo a juzgar por el perfil obtenido luego de cromatografía en capa delgada con Solvente D. La segunda incubación al permitir caracterizar  $FM^{32}P$ -Gal confiere especificidad al ensayo.

Los resultados del proceso total (Figura 49) indican que la formación de un compuesto con la movilidad del FMP-Gal es estimulada por UDP-Gal (Figura 49B) y que dicho estímulo es mayor cuando al sistema se agrega ficaprenol (Figura 49D).

Los compuestos con  $R_f = 0.85$  de las incubaciones C y D fueron eluidos y sometidos a tratamiento con fenol. El producto obtenido con UDP-Gal (incubación D) se degradó en un 60% en tanto el control sin UDP-Gal, (incubación C) solamente lo hizo en un 30%.



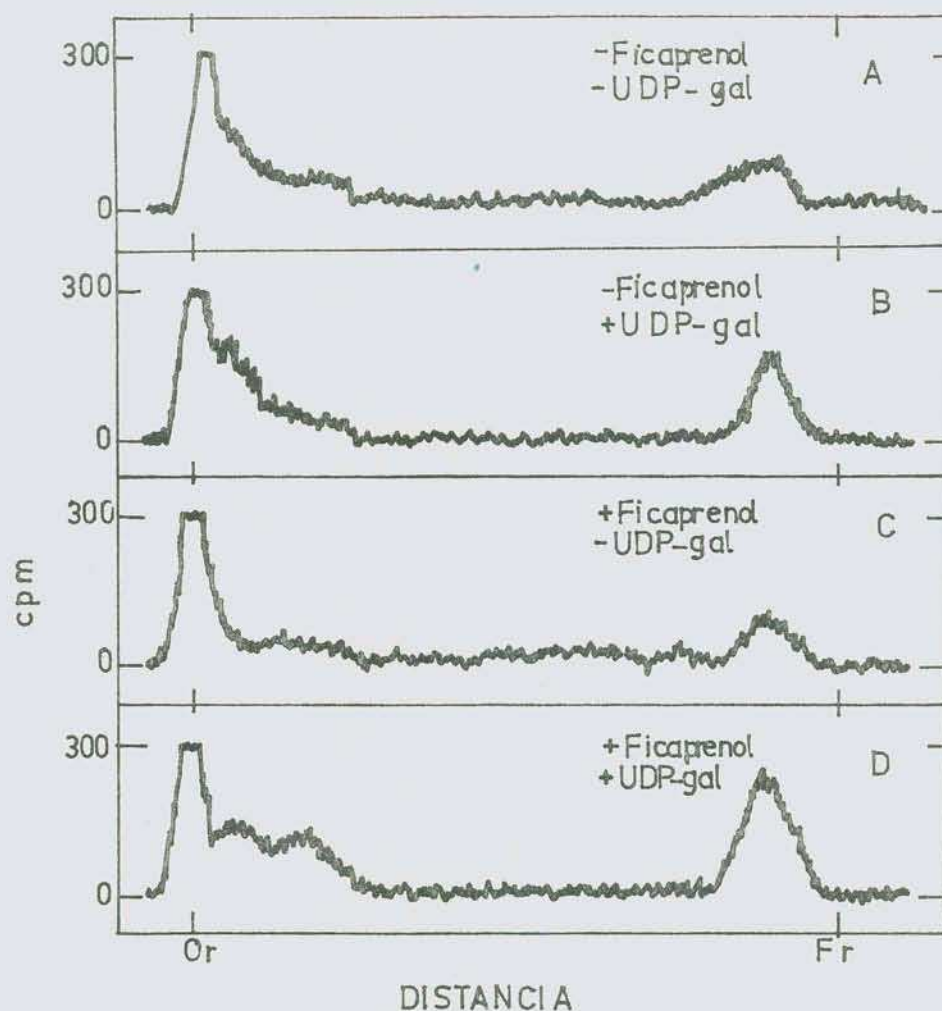


Figura 49: Prenol quinasa. La incubación se efectuó en 2 etapas (Materiales y Métodos). En la primera, la mezcla tipo contenía 62 nmoles de  $AT^{32}P$  ( $8.5 \times 10^8$  cpm/umol), 0.15% de Triton X-100, enzima  $P_{30}$  (189 ug proteína) y, donde se indica, 84 nmoles de ficaprenol (incubaciones C y D). En la segunda etapa, se agregaron 62 nmoles de UDP-Gal (incubaciones B y D) o se dejaron como control (incubaciones A y C). Los extractos butanólicos se analizaron por cromatografía en papel, con el Solvente E.



Las fases acuosas de ambas muestras se analizaron por electroforesis (Figura 50). Unicamente en el material proveniente de la incubación con UDP-Gal se observó un compuesto que migró como Gal-1- $^{32}\text{P}$ . En el control solo se detectó  $^{32}\text{Pi}$ .

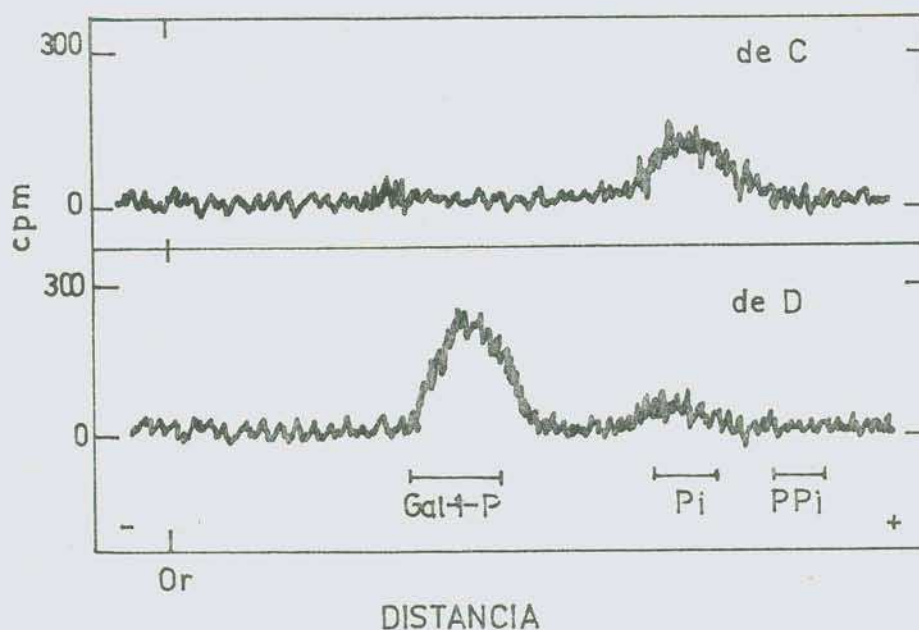


Figura 50: Prenol quinasa. Electroforesis en buffer acetato de piridinio, de las fases acuosas obtenidas por tratamiento fenólico de los compuestos C y D (Figura 49). Dicho tratamiento se hizo con 200 ml de fenol, 80% y 120 ml de agua, a 68-70°C durante 3 horas.

La identidad de la Gal-1- $^{32}\text{P}$ , se verificó por hidrólisis ácida (0.1 M HCl, 100°C, 10 minutos) y posterior electroforesis de los productos resultantes. En estas condiciones el 100% de la radioactividad migró como  $^{32}\text{Pi}$ . Esta labilidad al ácido es

característica de los ésteres fosfóricos unidos al carbón-1 del azúcar.

Resultados análogos a los presentados se obtuvieron con la enzima  $S_{48}$  y con células tratadas con EDTA.

#### Poliprenil pirofosfato fosfatasa.

Al estudiar la purificación del  $FM^{32}P$  se mencionó que el producto de fosforilación, cromatografiado en capa delgada con Solvente D daba cuatro compuestos (Figura 29). El compuesto 2 sometido a hidrólisis ácida liberó una mezcla de Pi y PPi (Figura 30). La producción de PPi hizo pensar que tal vez se tratara de ficaprenil-pirofosfato. Como este compuesto 2 era un componente menor y además muy difícil de recuperar de la sílica Gel no se pudo estudiar bien.

No obstante uno de los experimentos llevados a cabo concuerda con la estructura provisoriamente asignada y al mismo tiempo podría revelar la presencia, en el preparado enzimático usado ( $P_{30}$ ), de una poliprenil pirofosfato fosfatasa análoga a la descrita en *M. lysodeikticus* (157).

El experimento consistió en incubar al compuesto 2 con y sin enzima, y analizar toda la mezcla de incubación por electroforesis en papel. En estas condiciones tanto el compuesto 2 como el FMP no se mueven del origen. Los resultados se muestran en la Figura 51. La formación de Pi es mucho mayor en el incubado con enzima. Incubaciones análogas llevadas a cabo con  $FM^{32}P$

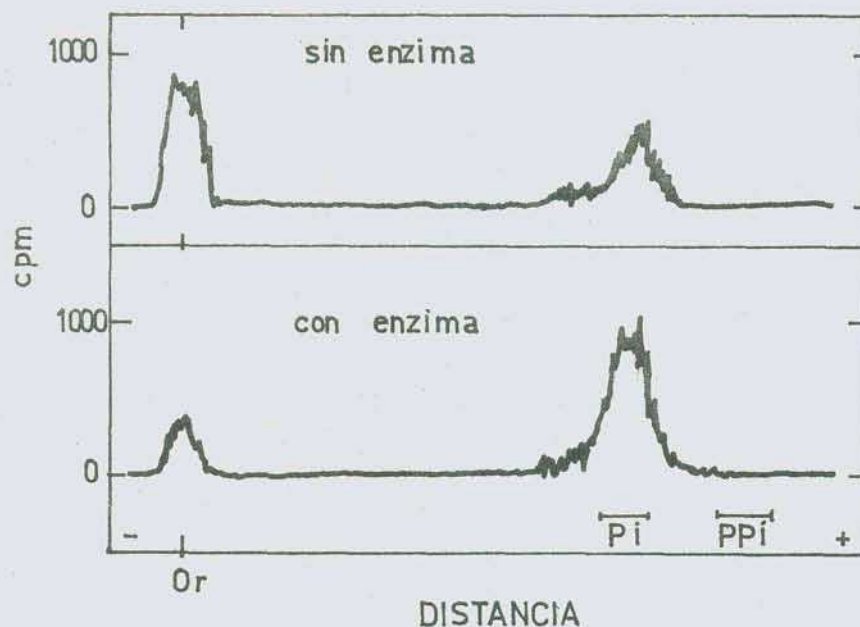


Figura 51: Electroforesis en buffer acetato de piridinio del compuesto 2 marcado con  $^{32}\text{P}$  (Figura 29) incubado con y sin enzima ( $\text{P}_{30}$ ). Las condiciones fueron las de la incubación tipo pero sin UDP-Gal y con Triton X-100 0,6%. Una vez finalizada la reacción se electroforetizó directamente el sobrenadante de la misma.

(compuesto 3 Figura 29) como control no indican liberación de  $^{32}\text{Pi}$  por parte de la enzima.

Estos resultados concuerdan con la capacidad estimulante observada en un componente de los preparados de FMP radioactivo o no. Este componente permanece en el origen de cromatogramas en capa delgada desarrolladas en Solvente C (Figuras 27 y 28). El pico del origen del cromatograma de la Figura 28 se utilizó como aceptor exógeno en una incubación llevada a cabo en presencia y

ausencia de UDP-Gal no radioactivo. Los extractos butanólicos de ambos incubados se sometieron a tratamiento con fenol 50% y en el material proveniente del incubado con UDP-Gal se logró aislar hexosa-1-<sup>32</sup>P, confirmando así que el componente del origen (cromatograma de la Figura 28) actúa como aceptor de galactosa.



### Aceptores lipídicos en plantas

Se intentó en colaboración con Rafael Pont Lezica, extender a sistemas vegetales el estudio llevado a cabo en bacterias.

Se tuvo en cuenta que en plantas se han descrito gran cantidad de poliprenoles, en su mayoría de carácter alílico (Tabla 3) y algunos lípido-fosfo-azúcares (Tabla 4). En estos últimos no se determinó con claridad la naturaleza del prenol.

El sistema enzimático elegido se obtuvo de epicotilos de arveja y se empleó UDP-( $^{14}\text{C}$ )-Glu como nucleótido-azúcar dador. Se estudió la incorporación de radioactividad a distintas fracciones. La Tabla 27 muestra un ensayo tipo. La mayor parte de la marca se

Tabla 27: Distribución de la radioactividad incorporada utilizando enzima de arvejas (P<sub>25</sub>).

Fracción	cpm incorporados
Butanol soluble	153.700
Lípidos neutros	130.000
Lípidos polares	5.413
Insoluble en etanol al 80%	23.788

Se incubó 60 minutos en las condiciones indicadas en Materiales y Métodos. La reacción se detuvo con butanol y luego se extrajo con el mismo solvente. Del material butanólico se contó una alícuota y el resto se analizó por cromatografía en papel Whatman DE-20 (solvente butanol saturado en agua), para separar los lípidos neutros de los polares. La fase acuosa se precipitó con etanol al 80% y el precipitado se contó luego de ser lavado varias veces con etanol de la misma concentración.

observó en la fracción butanólica, aunque una cantidad considerable se incorporó a material precipitable con etanol 80%.

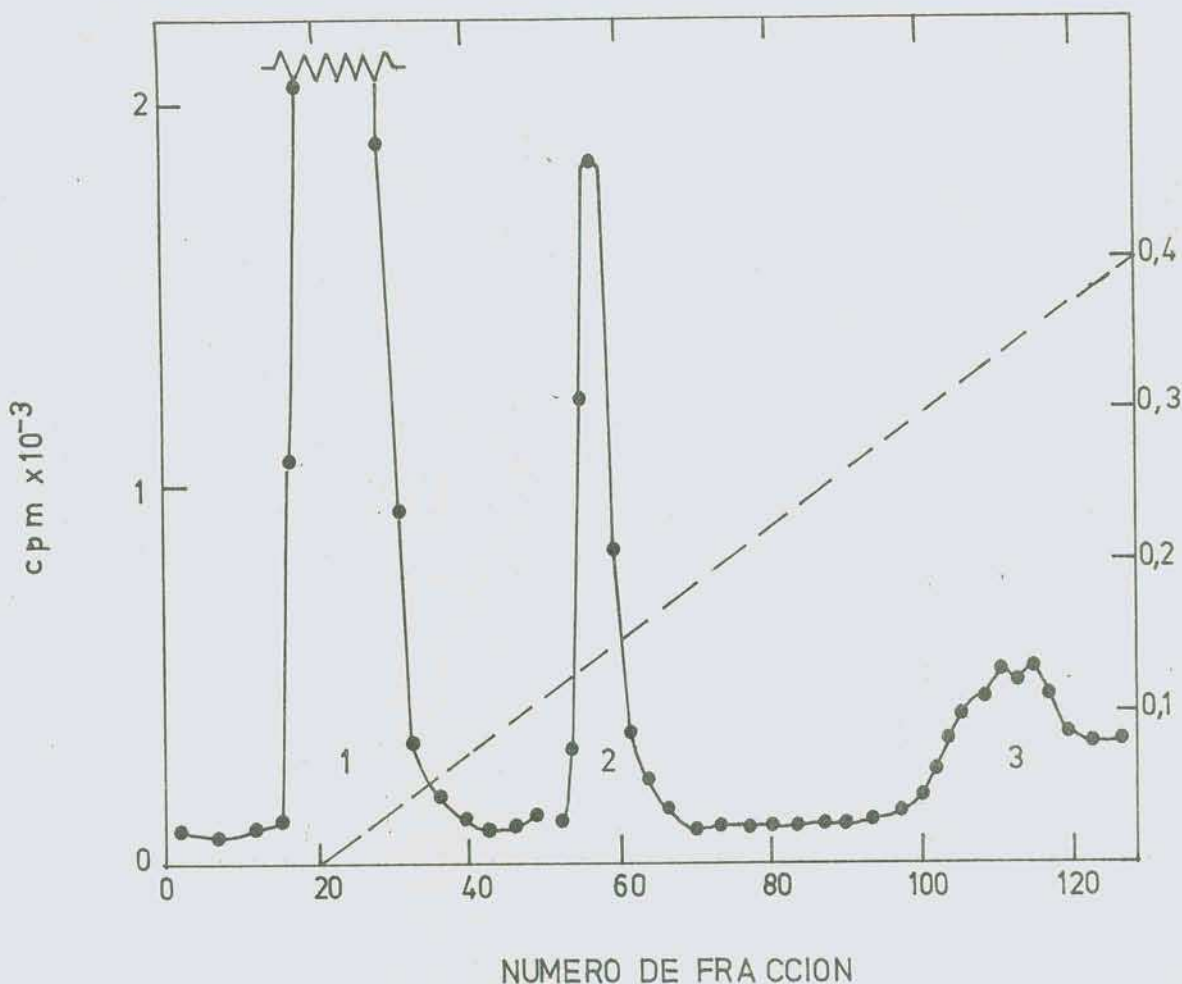


Figura 52: Análisis del material liposoluble por cromatografía en columna de DEAE-celulosa. Se incubó a 20°C, 30 minutos con la mezcla señalada para la enzima de arvejas. Para fraccionar el material obtenido se utilizó una columna de 1.2 x 60 cms y se eluyó en la forma indicada en Materiales y Métodos.

Solo se estudió con detalle la fracción liposoluble.

Analizada por cromatografía en papel Whatman DE-20 reveló la presencia de una gran cantidad de glucolípidos neutros y de una pequeña

fracción polar.

Análogo resultado se obtuvo por cromatografía en columna de DEAE-celulosa (Figura 52). Se observó una gran cantidad de radioactividad en la zona neutra (pico 1); y material cargado que eluyó entre 0.1-0.2 M acetato de amonio (pico 2) (es decir en la zona correspondiente a un monofosfato) y entre 0.3-0.4 M de la misma sal (pico 3). Es interesante señalar que si en vez de obtener el material a 20°C se incubaba a 0°C la relación de pico 2 a pico 3 se invierte (Figura 53).

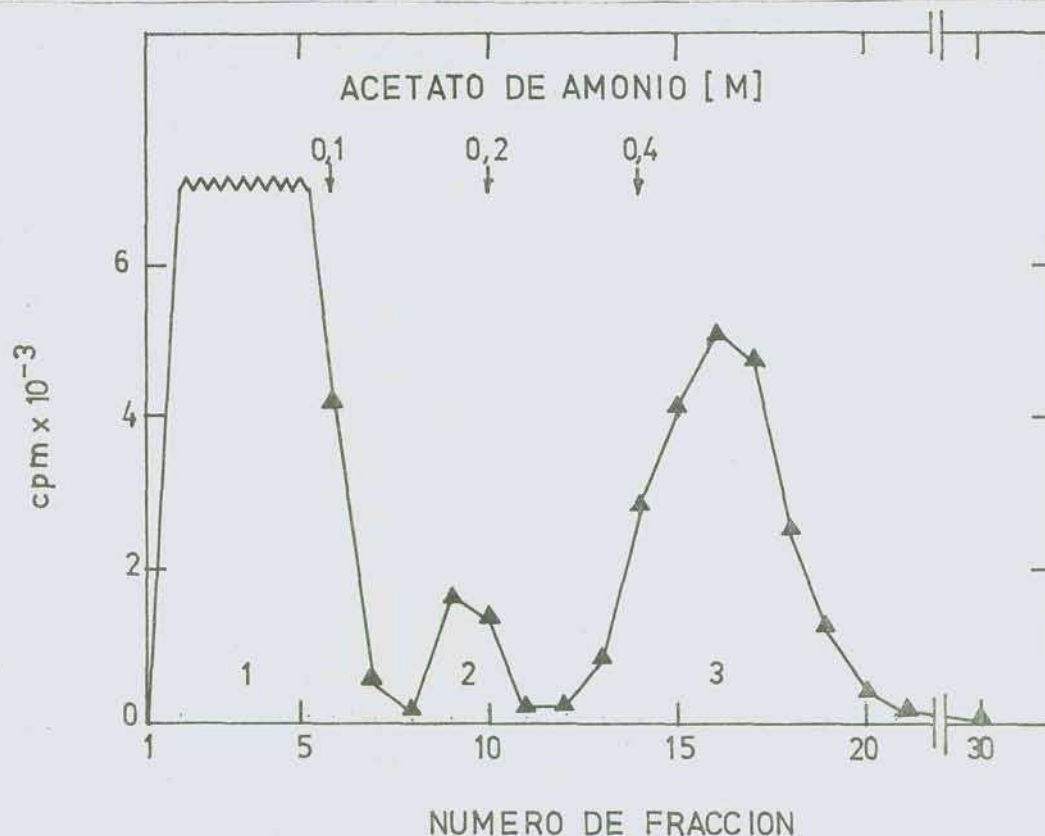


Figura 53: Cromatografía en columna de DEAE-celulosa de lípido-azúcares de arveja. La mezcla tipo se incubó a 0°C durante 90 minutos, contenía: 1.0 nmol de UDP-(<sup>14</sup>C)-Glu (268 uCi/umol) y enzima P<sub>25</sub>. El extracto butanólico se fraccionó en una columna chica, como se indica en Materiales y Métodos.

### Análisis pico 2.

De la fracción liposoluble solo se analizó con cierto detalle el pico 2, para lo cual se utilizaron las mismas técnicas aplicadas a los compuestos obtenidos con enzimas de *A. xylinum*.

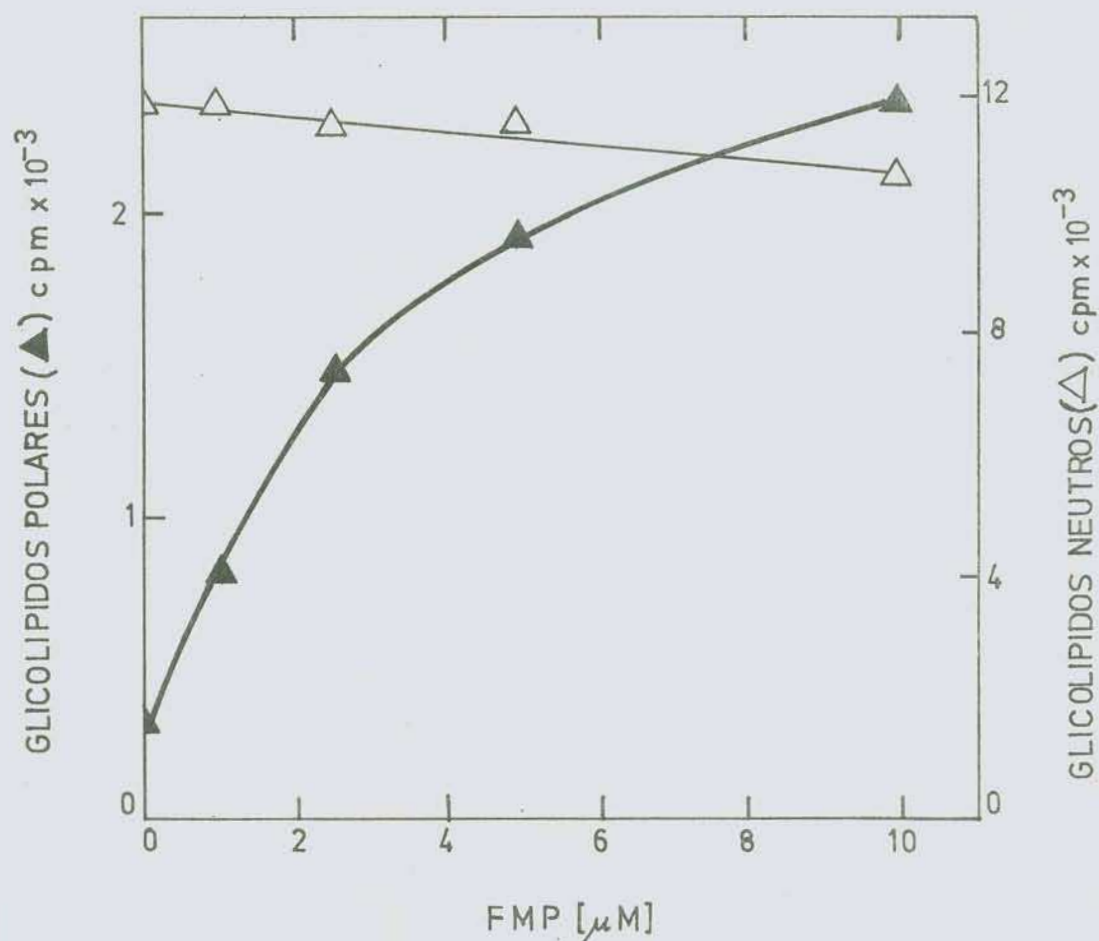


Figura 54: Efecto de la concentración de FMP. Condiciones de la incubación tipo, con 0.5% de Tritón X-114. La reacción se detuvo y extrajo con butanol. Los lípidos neutros y polares se determinaron por cromatografía de la fase butanólica en papel Whatman DE-20.

Por hidrólisis a pH 2 solo liberó glucosa.

Por cromatografía en el solvente básico E el pico 2 migró



con el frente, lo que indicaría que contiene un solo fosfato, confirmando así su perfil de elución de la columna de DEAE-celulosa. La estabilidad a las condiciones básicas suaves, descartó la presencia de un fosfolípido y apuntó hacia la naturaleza prenólica del lípido involucrado.

La capacidad de este sistema enzimático para utilizar aceptores exógenos también sugirió que la porción lipídica del Lípido-P-Glu es de naturaleza prenólica. Tanto el FMP como el DoIMP en presencia de Tritón X-100 estimularon la formación de este compuesto y no produjeron cambios apreciables en la síntesis de los lípido azúcares neutros, como se observa en la Figura 54 para el caso del FMP.

Utilizando  $\text{FM}^{32}\text{P}$  se determinó que éste era efectivamente sustrato de la reacción ya que se formó el  $\text{FM}^{32}\text{P}-(^{14}\text{C})\text{-Glu}$ .

#### Aceptor endógeno.

Se intentó también aislar el aceptor endógeno y con este objeto se prepararon extractos butanólicos del particulado enzimático, y se fraccionaron por cromatografía en columna de DEAE-celulosa. La presencia de aceptor se estableció midiendo con el sistema enzimático de arvejas la capacidad de estimular la formación del Lípido-P-Glu en cada una de las fracciones eluidas. La única fracción activa correspondió a una concentración salina de 0.1-0.2 M acetato de amonio. Esta es la concentración a la que se eluyen el FMP y DoIMP.

El aceptor endógeno así obtenido se hidrolizó a pH 2 y lo

mismo se hizo con controles de FMP y DolMP. Después se midió capacidad aceptora. En la Tabla 28 aparece el resultado: el aceptor de arvejas al igual que el DolMP fué resistente a la

Tabla 28: Tratamiento ácido del lípido aceptor de arvejas, FMP y DolMP.

Aceptor lipídico	Radioactividad incorporada en los aceptores		Aceptor descompuesto
	No tratada cpm	Tratada cpm	%
Arvejas	3211	2544	21
DolMP	7904	6800	14
FMP	5064	790	85

Las muestras se trataron con 0.01 N HCl, 10 minutos 100°C. Los lípidos se extrajeron con butanol y a dicha fracción se le ensayó la actividad aceptora.

hidrólisis ácida; esto estaría indicando que el lípido de arvejas es de tipo dolicólico, pues el FMP pierde un 85% de su capacidad aceptora.

Los resultados anteriores se confirmaron tratando FMP-(<sup>14</sup>C)-Glu, DolMP-(<sup>14</sup>C)-Glu y Lípido-P-(<sup>14</sup>C)-Glu con fenol en la forma ya vista.

Se observó (Tabla 29) que solo el FMP-(<sup>14</sup>C)-Glu fué degradado en su casi totalidad, no así el Lípido-P-(<sup>14</sup>C)-Glu.

Tabla 29: Tratamiento fenólico de los lípidos glucosilados.

Glucolípido	Fase fenólica cpm	Fase acuosa cpm	Degradación %
Lípido-P-( $^{14}\text{C}$ )-Glu(arvejas)	3028	292	9
DolMP-( $^{14}\text{C}$ )-Glu	1046	126	10
FMP-( $^{14}\text{C}$ )-Glu	514	2342	82

El tratamiento se efectuó como se señala en Materiales y Métodos durante 3 horas. El FMP-( $^{14}\text{C}$ )-Glu se preparó con enzima de arvejas, el DolMP-( $^{14}\text{C}$ )-Glu sintetizado con enzima de hígado fué gentilmente cedido por C. Brett.

Coincidentes con los resultados anteriores fueron los obtenidos por reducción catalítica de FMP-Glu, DolMP-Glu y de otro aceptor glucosilado obtenido por C. Brett con poroto de soja. Con este tratamiento tanto el aceptor glucosilado como el DolMP-Glu permanecieron practicamente inalterados en cambio el FMP-Glu se degradó.

Configuración del enlace Glu-P. Se estableció que el enlace azúcar - fosfato del Lípido-P-Glu era de configuración  $\beta$  siguiendo dos técnicas diferentes:

- Capacidad para formar el anhidroglucosano.- El Lípido-P-Glu sometido a tratamiento alcalino (0.1 N NaOH en propanol 99%, 65-68°C), se degradó en un 83% originando un compuesto que por cromatografía en papel con el Solvente H se comportó como 1,6 anhidroglucosano.

La identidad del glucosano se confirmó por hidrólisis ácida (1N HCl, 100°C, 10 minutos) y cromatografía en el Solvente H,



donde migró como glucosa.

- Sensibilidad a la  $\beta$ -fosfoglucomutasa.- Como se indicó, el lípido-fosfato-azúcar de arvejas es insensible al tratamiento fenólico (Tabla 29) por lo que se infirió que es  $\alpha$ -saturado; por el contrario los derivados glicosilados de los esteres fosfóricos de los prenoles alílicos producen el azúcar-fosfato correspondiente (Figura 25 y 26). Basándose en dicha propiedad y suponiendo que la estereoespecificidad de la enzima glucosilante es la misma para el aceptor endógeno, que para los aceptores exógenos, se procedió a incubar en presencia de un exceso de FMP. La mezcla que se formó en estos casos contenía aproximadamente un 15% de Lípido-P-Glu y un 85% de FMP-Glu. Esta mezcla se trató con fenol al 50%, obteniéndose en la fase acuosa un producto con las características de la Glu-1-P. Esta Glu-1-P se aisló por electroforesis en acetato de piridinio y se incubó con  $\beta$ -fosfoglucomutasa obteniéndose un 40% de Glu-6-P. Un control realizado en las mismas condiciones con  $\alpha$ -Glu-1-P mostró un 9% de conversión posiblemente por la presencia de  $\alpha$ -fosfoglucomutasa en la preparación enzimática.



### DISCUSION

Para aclarar la estructura de la fracción lipídica de los lípido-fosfo-azúcares descritos en *Acetobacter xylinum*, existían como se ha señalado, 3 vías posibles:

- 1) Utilizar un compuesto presumiblemente análogo como aceptor exógeno.
- 2) Aislar el lípido endógeno.
- 3) Estudiar la biosíntesis del lípido a partir de un precursor radioactivo.

Se siguieron las dos primeras ya que la tercera posibilidad se descartó porque experimentos previos (llevados a cabo por R. García) habían demostrado que estas células no son permeables al ácido mevalónico, precursor específico de los poliprenoides.

Como aceptor análogo se utilizó principalmente el FMP y en experimentos preliminares llevados a cabo en presencia de UDP-(<sup>14</sup>C)-Glu se observó que:

- a) El FMP estimula la incorporación de radioactividad a material soluble en butanol solamente en presencia de detergentes. Otros tratamientos como agitación en vortex, sonicación, elevación de temperatura, etc. no son capaces de reemplazar a los detergentes.
- b) El detergente por sí mismo estimula la incorporación (Tabla 5), y de los preparados enzimáticos ensayados para obtener el máximo de estímulo con FMP y detergente, y un mínimo con detergente solo (células tratadas tanto con EDTA como con lisozima o tolueno, fracciones celulares obtenidas por desintegración con celdas de French o Nossal)

(Tablas 5 y 6), el mejor resultó ser la fracción precipitable a 30.000 x g (Enzima P<sub>30</sub>) obtenida con el desintegrador de Nossal.

Si el detergente se reemplaza por cefalina, un fosfolípido generalmente presente en bacterias, no se observa activación alguna (Tabla 9). El papel activador de la cefalina y de la cardiolipina ha sido descrito en otros sistemas de bacterias (151, 214).

c) El producto obtenido tiene las propiedades del Lípido-P-Gal (Figura 14).

En las condiciones utilizadas solo ocasionalmente se encontró además Lípido-PP-Glu, y en pequeña cantidad (Figura 15). Por este motivo el estudio se concentró en la incorporación de galactosa directamente a partir de UDP-Gal, a material soluble en solventes orgánicos.

La presencia de galactosa en el producto no sorprendió pues ya se sabía que el sistema enzimático utilizado contiene UDP-Gal-4-epimerasa (68).

#### Incorporación a partir de UDP-Gal

En presencia de este nucleótido azúcar las incorporaciones fueron mucho mayores que con UDP-Glu (Tabla 10). También en este caso se buscaron condiciones en las que el efecto estimulante del detergente fuera mínimo. (Tablas 11 y 12). Se ensayaron varios detergentes, que en presencia de FMP incrementaron la síntesis de material liposoluble. Pero el estímulo máximo se produjo nuevamente

en presencia de Triton X-100 (Figura 21), aunque Zonyl A y desoxicolato de sodio produjeron incrementos apreciables. En presencia de Triton X-100 se obtuvo para el UDP-Gal un Km aparente de  $3 - 6 \times 10^{-5}$  M y para el FMP igual a  $1 \times 10^{-5}$  M (Figura 20).

Por otra parte las incorporaciones de galactosa obtenidas con exceso de sustrato (Figuras 17 y 18) o, en incubaciones durante tiempos largos (Figura 19) fueron siempre muy altas (60-75%).

La identificación del producto formado en presencia de FMP y Triton X-100 se hizo empleando: cromatografía en papel en los solventes E y F (Figura 22), cromatografía en columna de DEAE-celulosa (Figura 23), hidrólisis a pH2 y posterior caracterización del producto hidrosoluble como galactosa (Figura 24), tratamiento fenólico (Figura 25) y ulterior caracterización de la Gal-1-P formada (Figura 26); y reducción catalítica en presencia de platino (Tabla 14). Todos estos tratamientos indican que el compuesto obtenido en presencia de FMP se comporta como el Lípido-P-Gal sintetizado a partir del aceptor lipídico endógeno.

La configuración de la unión fosfato-azúcar es la misma en el Lípido-P-Gal y en el compuesto formado por estimulación con FMP: ambos forman 1,6-anhidrogalactosano cuando se los somete a un tratamiento alcalino fuerte, revelando la presencia de la configuración  $\beta$

Confirmación del carácter de sustrato para el FMP.— Aunque los resultados arriba mencionados son ya un buen índice del carácter de sustrato desempeñado por el FMP, la evidencia más categórica se obtuvo utilizando  $\text{FM}^{32}\text{P}$ .



En presencia de este compuesto y de UDP-Gal, tanto no radioactivo como marcado con  $^{14}\text{C}$  se formó un producto con las propiedades del Lípido-P-Gal que contenía  $^{32}\text{P}$  y que sometido a degradación con fenol produjo un compuesto análogo a la galactosa-1- $^{32}\text{P}$ . Cuando se utilizaron los dos radioisótopos se estableció además que la galactosa y el fosfato se hallaban en relación molar. De esta manera quedó demostrado que el  $^{32}\text{P}$  originalmente unido al ficaprenol se había unido luego a la galactosa provista por el UDP-Gal.

#### Otros aceptores lipídicos

El sistema enzimático estudiado utiliza no solo el FMP como aceptor exógeno sino también al DolMP, aislado directamente de hígado de cerdo u obtenido por fosforilación química de dolicol de la misma fuente.

Sin embargo aceptores lipídicos de tipo  $\alpha$ -saturado descritos en otras fuentes (arveja, soja e insectos (97, 98)) no tienen capacidad activadora en este sistema (Tabla 20). Estos resultados negativos no deben considerarse concluyentes pues solo se utilizaron extractos crudos y no se intentó su purificación.

El hecho de que en el sistema de Acetobacter estudiado tanto el FMP como el DolMP sean sustratos (Tabla 20) indica una cierta inespecificidad de la enzima con respecto a la longitud de la cadena y al estado de saturación de la unidad  $\alpha$  del prenol. Sin embargo a bajas concentraciones el FMP, es mejor sustrato que el DolMP (Figura 42). Como estos dos compuestos difieren además en el número de dobles enlaces trans, no es posible extraer conclusiones con respecto a la influencia



de cada uno de estos factores sobre la especificidad del sistema enzimático. Como ya se dijo el comportamiento del compuesto obtenido con el aceptor endógeno (Lípido-P-Gal) es idéntico al obtenido en presencia de FMP. El producto sintetizado en presencia de DolMP es diferente: es resistente al tratamiento fenólico (Tabla 22) y a la reducción catalítica (Tabla 14). Esta puede tomarse como una evidencia más del carácter alílico del aceptor endógeno. Por otra parte este comportamiento diferencial de los productos obtenidos en presencia de FMP y DolMP frente a los tratamientos señalados (fenol 50% y reducción catalítica) permite disponer de una herramienta sencilla para distinguir entre lípido-azúcares derivados de prenoles alílicos (ficaprenol) o de  $\alpha$ -saturados (dolicol) y provee la posibilidad de utilizar prenil-fosfatos no radioactivos como marcadores.

#### Estudio del aceptor aislado de *Acetobacter xylinum*.-

El otro camino seguido para caracterizar el resto lipídico de los lípido-fosfato-azúcares fué proceder directamente a su aislamiento. Este se emprendió al comprobarse la factibilidad de obtener material suficiente como para caracterizarlo por espectrografía de masa. Como fuente se utilizó a la cepa B42 de *A. xylinum*, con la que se han realizado los estudios presentes. Pero puesto que la producción de celulosa que la caracteriza dificulta su manipulación, se utilizó también la cepa 8747. Esta cepa no produce celulosa (68) y, tampoco se ha detectado in vitro la formación de lípido-fosfo-azúcares (68). No obstante, al buscar lípido-fosfatos libres, se

encontró que también esta cepa producía un compuesto que estimulaba la síntesis de Lípido-P-Gal en presencia de enzima obtenida a partir de la cepa B42.

Debe destacarse que la cepa B42 produce casi el doble de aceptor (por gramo de células húmedas) que la cepa 8747 (Tabla 17). Quizá en esto probablemente tenga cierta incidencia la incapacidad ya mencionada de esta última cepa para sintetizar lípido-fosfato-azúcares y celulosa. Pero por otra parte la presencia de aceptor en esta cepa es justificable pues en la síntesis de la pared celular se requiere también prenil-fosfatos (15, 21).

El aceptor aislado posee la misma labilidad al ácido que el FMP en tanto que el DolMP es resistente (Tabla 19). Este resultado añade una nueva evidencia en el sentido de que el lípido fosfato endógeno es de carácter alílico.

El espectro de masa del aceptor aislado y defosforilado por tratamiento ácido revela efectivamente la presencia no solo de undecaprenol sino también de deca- y nonaprenol (Figura 41).

Sin embargo la presencia de otros compuestos, posiblemente de carácter isoprenoideo, en cantidades mucho mayores, abren la posibilidad de que también ellos sean responsables de la capacidad aceptora.

De todos modos, se puede afirmar con bastante fundamento que el aceptor endógeno es un poliprenol fosforilado, de tipo alílico.

### Síntesis de Lípido-PP-Glu

En la introducción se mencionó que preparados de *Acetobacter xylinum* acumulan in vitro, a partir de UDP-(<sup>14</sup>C)-Glu, una sustancia a la que se asignó la estructura Lípido-PP-Glu (68). También se mencionó que este compuesto es un intermediario en la síntesis de un glucano.

Siguiendo un esquema análogo al utilizado en el caso del Lípido-P-Gal se trató de lograr, por el agregado de FMP exógeno una estimulación en la formación del Lípido-PP-Glucosa. Esta parte del trabajo se desarrolló en colaboración con R. García.

Como ya se discutió, en un principio no se tuvo éxito, pues en las condiciones del ensayo se inhibían tanto la síntesis del Lípido-PP-Glu (68) como la del glucano (Figura 16). Pero trabajando a 0°C y baja concentración de Triton X-100 (0.09-0.12%) se lograron estímulos reproducibles (Figura 43). En realidad ya se sabía que a bajas temperaturas, aunque en ausencia de detergentes, la acumulación de Lípido-PP-Glu es máxima, y que la formación de polímero estaba prácticamente bloqueada (73).

La aplicación de las mismas técnicas analíticas utilizadas para el estudio del Lípido-P-Gal: hidrólisis a pH2, columna de DEAE-celulosa (Figura 45), tratamiento fenólico, cromatografía en solventes E, F y H y experimentos con doble marca (Figura 46), permitieron confirmar que se forma Ficaprenil-PP-Glu de acuerdo a la siguiente reacción:





Consecuentemente, es bastante probable que el aceptor endógeno sea un prenol monofosfato.

En cuanto a la especificidad del complejo enzimático involucrado en esta reacción, es poco lo que puede afirmarse. Si bien el DolMP no produce estimulación en las condiciones del ensayo, tampoco la producen extractos lipídicos de las mismas células que deberían contener el aceptor. Dichos extractos, en cambio, activan enormemente la incorporación de galactosa (Tabla 18, 19 y Figura 40).

Posiblemente la presencia de fosfolípidos y otros contaminantes altere en forma apreciable los requerimientos de la reacción y la relación enzima-sustrato-detergente.

Una importante evidencia adicional que, a la vez reafirma la funcionalidad del FMP como sustrato, se obtuvo incubando a una temperatura intermedia (15°C), ya que se observó incremento en la formación del intermediario lipídico y también en la de polímero (Tablas 23 y 24 y Figura 47).

Por último, utilizando no ya enzima P<sub>30</sub> sino células tratadas con EDTA, se observó, agregando FMP y Triton X-100 (Tabla 25), un leve incremento no solo en la formación de polímero sino también en la de los 3 lípido-azúcares descritos en *A. xylinum* (Lípido-P-Gal, Lípido-PP-Glu y Lípido-PP-Cel). Este resultado puede considerarse como una evidencia más en el sentido de que sobre un aceptor común se forman los tres lípido-azúcares, dos de los cuales, a su vez, intermediarían la síntesis del glucano.



Estudio de algunas enzimas del ciclo biosintético  
del aceptor lipídico

De acuerdo a lo que se conoce con respecto a la biosíntesis de los poliprenil-fosfatos del tipo de los estudiados, estos se formarían a partir de ácido mevalónico, como se observa en el esquema siguiente (16).

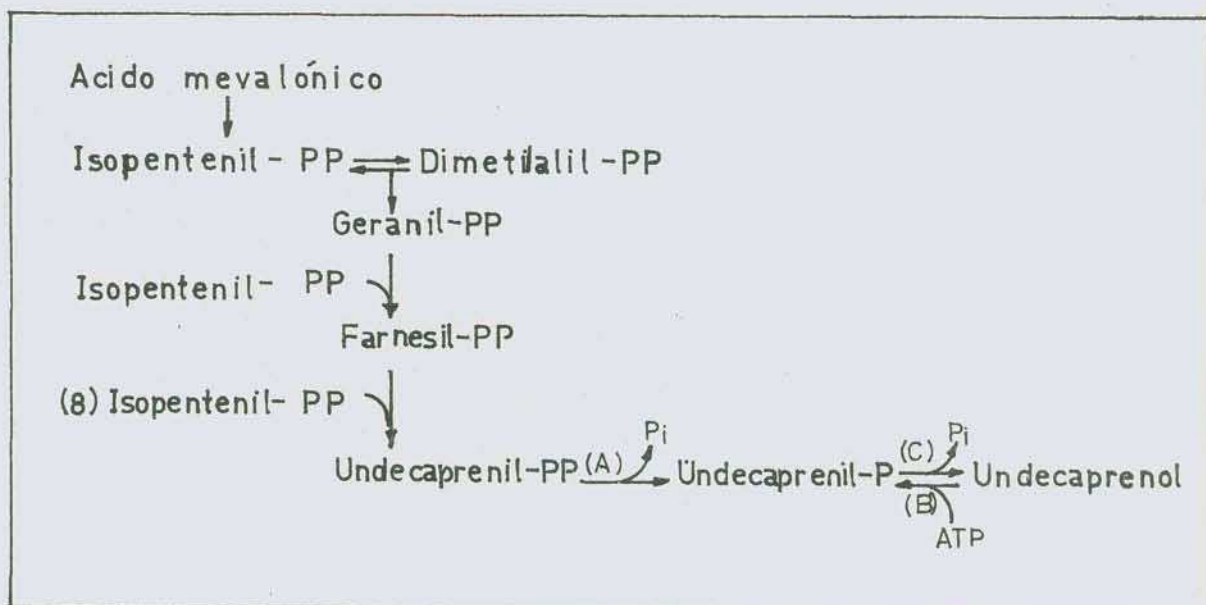


Figura 55: Esquema biosintético del Undecaprenil-P (16).

El producto final de esta secuencia es un poliprenil-pirofosfato, el cual para funcionar como aceptor de azúcares debe hidrolizarse a monofosfato. Este paso es mediado por una poliprenil pirofosfato fosfatasa (A) (157). En *S. aureus* se ha descrito una segunda

defosforilación que lleva al undecaprenil monofosfato a alcohol libre. Esta reacción es catalizada por una poliprenil monofosfato fosfatasa (C) (160). La fosforilación del undecaprenol mediante una quinasa (B) y ATP ha sido descrita también en *S. Aureus* (161) y constituye una vía alternativa para la obtención de Undecaprenil-P.

Algunas de estas actividades enzimáticas han sido ahora detectadas en *A. xylinum*.

Quinasa.— Evidencias para la presencia de esta enzima se encontraron utilizando  $AT^{32}P$  y prenol exógeno. Aunque las cantidades de lípido-fosfato ( $^{32}P$ ) formado fueron pequeñas, su existencia se confirmó al obtener Lípido- $^{32}P$ -Gal. Este compuesto a su vez, mediante tratamiento fenólico liberó Gal-1- $^{32}P$  (Figura 50). Esto prueba la transferencia de  $^{32}Pi$  del  $AT^{32}P$  a un aceptor lipídico y su funcionalidad como sustrato de la galactosiltransferasa.

Poliprenil-PP-fosfatasa.— Indicios de la presencia de una enzima de este tipo se obtuvieron por el hecho de que la formación de Lípido-P-Gal es estimulada por el ficaprenil-difosfato, radioactivo o no. Como este último material proviene de una cromatografía en capa delgada no puede descartarse la posibilidad que se hidrolice a monofosfato durante la elución. Sin embargo el carácter enzimático de esta hidrólisis se evidenció por incubaciones llevadas a cabo con lípido-difosfato radioactivo (pico 2 Figura 29) las que produjeron la liberación de  $^{32}Pi$  (Figura 51), liberación que no ocurre en presencia de  $FM^{32}P$  (pico 3 Figura 29).

No se hallaron pruebas sobre la existencia de poliprenil monofosfato fosfatasa (C), cuando se incubó FM<sup>32</sup>P purificado, con enzima P<sub>30</sub>.

#### Aceptores de galactosa

Dado que en *A. xylinum* solo se han descrito homopolímeros que contienen glucosa (174-176), la función del Lípido-P-Gal, el cual presenta todas las características de un dador de galactosa, debería estar orientada hacia la síntesis de un heteropolisacárido o una glicoproteína. Pensando en que fuera lo primero, se procedió al aislamiento de polisacáridos, encontrándose por lo menos cuatro de diversa composición (Tabla 26), aunque ninguno reveló poseer galactosa según las técnicas de análisis utilizadas.

Los resultados obtenidos no permiten responder al interrogante planteado sobre el destino final de la galactosa. Esta puede formar parte de polisacáridos presentes en otras fracciones celulares no estudiadas y/o de glicoproteínas.

#### Aceptores lipídicos en plantas

El estudio llevado a cabo con *A. xylinum* permitió aislar una serie de lípido-fosfo-azúcares: Lípido-P-Gal, Lípido-PP-Glu y Lípido-PP-Cel, de los cuales los dos últimos son intermediarios en la síntesis de un glucano de alto peso molecular (73).

Por sus características tanto el Lípido-PP-Glu como el Lípido-PP-Cel (68) podrían ser intermediarios en la biosíntesis de celulosa. Teniendo en cuenta esta idea y en colaboración con



R. Pont Lezica se decidió llevar a cabo un estudio similar en plantas. Existían además dos circunstancias adicionales que hacían más interesante dicha investigación:

a) Las plantas son la fuente más importante de prenoles alílicos, tanto libres como esterificados (Tabla 3).

b) No estaba aclarada la naturaleza de la fracción lipídica de los lípido-fosfo-azúcares ya descritos en algunos vegetales (87 - 96).

Como sistema enzimático se eligió un particulado de epicotilos de arveja y se utilizaron las mismas técnicas analíticas empleadas en bacterias. Los resultados iniciales indicaron que existen al menos dos tipos de compuestos lipofílicos capaces de aceptar glucosa: neutros y aniónicos (Figura 52). Los primeros fueron caracterizados como esteril-glucósidos, pero en nuestro caso el estudio se centró en los últimos. La Figura 52 señala la presencia de dos lípidos cargados: uno que eluye como lípido monofosfato y otro, en menor cantidad que eluye como lípido pirofosfato.

El análisis de la fracción lipídica del lípido monofosfato indica que es de tipo dolícólico. Es claro el paralelismo entre el comportamiento del Lípido-P-Glu (sintetizado con el aceptor endógeno) y el DolMP-Glu (preparado ya sea con enzima de arvejas o con la fracción microsomal de hígado de rata) frente a tratamientos degradativos tales como reducción catalítica y fenol 50% (Tabla 29), cuyo valor diagnóstico ha sido señalado para el sistema de *A. xylinum*.

La activación en la formación de Lípido-P-Glu obtenida mediante la adición de FMP, (radioactivo o no) y DolMP indicaría



una falta de especificidad enzimática con respecto al grado de saturación de la unidad  $\alpha$ , al número de enlaces trans y a la longitud de la cadena poliprenólica. Esto es similar a lo visto en *Acetobacter xylinum* para el caso de la síntesis del Lípido-P-Gal.

El hecho de que en el sistema estudiado el prenol posea las propiedades de los dolicoles, apoya la idea ya señalada (Tabla 4) de que una característica de eucariotes sería que la parte lipofílica de los lípido-fosfato-azúcares es  $\alpha$ -saturada, cuando el prenol es de cadena lineal; en procariotes en cambio, sería de tipo alílico. A esta circunstancia podría asignarsele una cierta relevancia desde el punto de vista evolutivo.

La presencia de un lípido  $\alpha$ -saturado responsable de la carga de azúcares es sorprendente si se piensa que en plantas los prenoles descritos son de tipo alílico (Tabla 3), con la sola excepción de un dolicol aislado del "spadix" de *Arum maculatum* (39). Esto plantea ahora un nuevo interrogante: ¿Cuál es la función que cumplen en los vegetales los prenoles alílicos que son, con mucho, los más abundantes?

Finalmente, el otro compuesto cargado en DEAE-celulosa se eluye como un lípido pirofosfato pero no ha sido investigado en detalle. Análogamente a lo que sucede en *A. xylinum* se acumula a baja temperatura (Figura 53).

El aceptor final de estos azúcares no se conoce, pero la formación de material insoluble en etanol o TCA (Tabla 27) observada en el mismo sistema permite sospechar que los lípido-azúcares aislados desempeñan el papel de intermediarios.

### CONCLUSIONES

1) La fracción enzimática  $P_{30}$  (es decir, los fragmentos celulares de *Acetobacter xylinum*, obtenidos en un desintegrador de Mossal que precipitan entre 480 y 30.000 x g) es la más adecuada para estudiar la reacción:



pues el estímulo en la formación de Lípido-P-Gal por el agregado de detergentes es mínimo, y máximo, en presencia de detergente y FMP.

En ausencia de detergentes no hay activación por FMP. El detergente más eficiente es el Triton X-100 en una concentración 0.2-2.4%.

2) En presencia de Triton X-100 el  $K_m$  aparente para el UDP-Gal es  $3-6 \times 10^{-5}M$  y para el FMP  $1 \times 10^{-5}M$ .

3) El DolMP es también sustrato de esta reacción aunque menos eficiente que el FMP.

4) Extractos lipídicos de *A. xylinum* fraccionados por cromatografía en columnas de DEAE-celulosa, también estimulan la formación de Lípido-P-Gal.

5) Los productos obtenidos con aceptor endógeno, FMP y extractos lipídico de *A. xylinum* tienen idénticas propiedades. El obtenido en presencia de DolMP, en cambio, es resistente a la degradación por fenol y a la reducción catalítica.

6) Sometidos a una hidrólisis ácida suave tanto el FMP como el extracto lipídico de *A. xylinum* pierden su capacidad estimulante. No así el DolMP, que conserva dicha propiedad.

7) Utilizando UDP-( $^{14}\text{C}$ )-Gal y FM $^{32}\text{P}$  se obtuvo un producto con una relación molar  $\text{P}^{32}/^{14}\text{C} = 1$ , que por degradación con fenol produjo ( $^{14}\text{C}$ )-Gal- $^{32}\text{P}$ . Se confirmó así que el FMP es un sustrato de la reacción.

8) La porción lipídica del aceptor endógeno de *A. xylinum* es un poliprenol de tipo alílico. El espectro de masa confirmó esta suposición pero no permitió aclarar totalmente su estructura.

9) La enzima que cataliza la reacción 1) no es muy específica ni para el largo de cadena de poliprenol ni para la presencia o no de una doble ligadura en su unidad  $\alpha$ , ni para el número de enlaces trans.

10) Extractos lipídicos obtenidos de *Acetobacter xylinum* 8747, una cepa que no sintetiza celulosa, también estimulan la formación Lípido-P-Gal pero en menor grado que los obtenidos de cepas que producen celulosa. Este resultado se justifica aceptando que el aceptor de galactosa y el que interviene en la síntesis de la pared celular o mureína son similares. En la mutante 8747 faltaría entonces la enzima galactosilante, pues en ella no se pudo detectar la formación de Lípido-P-Gal.

11) Con la misma fracción enzimática  $\text{P}_{30}$  se estudió también la reacción:



Como se ha señalado este Lípido-PP-Glu es intermediario en la síntesis de un glucano (73).



En este caso el agregado de FMP produjo estimulación simultánea en la formación de Lípido-PP-Glu y del glucano, cuando se incubó a bajas temperaturas (0-15°C) y en presencia de 0.1% Triton X-100.

12) Con el DolMP no se obtuvo efecto alguno. Tampoco con los extractos lipídicos de *A. xylinum*.

13) En este caso también el Lípido-P aceptor es un Poliprenol-P de tipo alílico.

14) Utilizando como sistema enzimático células tratadas con EDTA en vez de la fracción P<sub>30</sub>, a 15°C se obtuvo, por el agregado de FMP, un ligero estímulo en la síntesis de Lípido-P-Gal, Lípido-PP-Glu, Lípido-PP-Cel y polímero simultáneamente.

15) Se logró detectar la presencia de las dos actividades enzimáticas siguientes, vinculadas al metabolismo de los prenol-fosfatos:



16) Se detectó la presencia de cuatro compuestos que contienen glucosa, manosa, ramnosa y ácidos urónicos. Dos neutros y 2 aniónicos.

17) El sistema enzimático de epicotilos de arveja sintetiza al menos 2 lípido-fosfato-azúcares cargados negativamente, uno de los cuales resultó ser Lípido-P- $\beta$ -Glu.

18) La porción lipídica del Lípido-P-Glu obtenido con el sistema de arvejas tiene las propiedades de un prenol  $\alpha$ -saturado.



19) La enzima que sintetiza Lípido-P-Glu, también es inespecífica con respecto al prenil-fosfato utilizado ya que tanto el FMP como el DoIMP le sirven como sustratos.

20) De acuerdo a lo conocimientos actuales (Tabla 4) y a los resultados obtenidos con *Acetobacter xylinum* y epicotilos de arveja, se puede generalizar diciendo que la parte lipídica de los lípido-fosfato-azúcares ( formados por un prenil de cadena lineal) es  $\alpha$ - saturada en los sistemas eucarióticos y  $\alpha$ -insaturada en los procariotes.

W. Dan L. T.

Romero

BIBLIOGRAFIA

1. Leloir, L.F. y Cardini, C.E. (1957) J. Am. Chem. Soc. 79, 6340-6341.
2. Leloir, L.F., Olavarria, J.M., Goldemberg, S.H. y Carminatti, H. (1959) Arch. Biochem. Biophys. 31, 508-520.
3. Ryman, B.E. y Whelan, W.J. (1971) en Advances in Enzymology (Ed. Nord, F.F.) Vol. 34, Interscience Publishers, Nueva York, p. 285-443.
4. Stalmans, W. y Hers, H.G. (1973) en The Enzymes (Ed. Boyer, P.D.) Vol. IX, Academic Press, Nueva York y Londres, 3a. ed., p. 309-361.
5. Fekete, M.A.R. de, Leloir, L.F. y Cardini, C.E. (1960) Nature 187, 918-919.
6. Leloir, L.F., Fekete, M.A.R. de y Cardini, C.E. (1961) J. Biol. Chem. 236, 636-641.
7. Recondo, E. y Leloir, L.F. (1961) Biochem. Biophys. Res. Commun. 6, 85-88.
8. Preiss, J. (1969) en Current Topics in Cellular Regulation (Ed. Horecker, B.L. y Stadtman, E.R.) Vol. 1, Academic Press, Nueva York y Londres, p. 125-160.
9. Hassid, W.Z. (1967) en Metabolic Pathways (Ed. Greenberg, D.M.) Vol. I, Academic Press, Nueva York y Londres, 3a ed., p. 307-393.
10. Nikaído, H. y Hassid, W.Z. (1971) en Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry (Ed. Tipson, R.S. y Horton, D.) Vol. 26, Academic Press, Nueva York y Londres, p. 351-483.

11. Pindar, D.F. y Lucke, C. (1975) *Biochem. J.* 152, 617-622.
12. Anderson, J.S., Matsubashi, M., Haskin, M.A. y Strominger, J.L. (1965) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 53, 881-889.
13. Weiner, I.M., Higuchi, T., Rothfield, L., Saltmarsh-Andrew, M., Osborn, M.J. y Horecker, B.L. (1965) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 54, 228-235.
14. Wright, A., Dankert, M. y Robbins, P.W. (1965) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 54, 235-241.
15. Osborn, M.J. (1969) *Ann. Rev. Biochem.* 38, 501-538.
16. Lennarz, W.J. y Scher, M.G. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 265, 417-441.
17. Hemming, P.W. (1974) en *MTP International Review of Science, Biochemistry Series One* (Ed. Goodwin, T.W.) Vol. 4, Butterworths, Londres y University Park Press, Baltimore, Maryland, p. 39-97.
18. Behrens, N.H. (1974) en *Biology and Chemistry of Eucariotic Cell Surfaces* (Ed. Lee, E.Y.C. y Smith, E.E.) Vol. 7, Academic Press, Nueva York, San Francisco y Londres, p. 159-180.
19. Waechter, C.J. y Lennarz, W.J. (1976) *Ann. Rev. Biochem.* 45, 95-112.
20. Wright, A., Dankert, M., Fennessey, P. y Robbins, P.W. (1967) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 57, 1798-1803.
21. Higashi, Y., Strominger, J.L. y Sweeley, C.C. (1967) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 57, 1878-1884.
22. Lahav, M., Chiu, T.H. y Lennarz, W.J. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 5890-5898.

23. Takayama, K. y Goldman, D.S. (1970) J. Biol. Chem. 245, 6251-6257.
24. Takayama, K., Schnoes, H.K. y Semmler, E.J. (1973) Biochim. Biophys. Acta 316, 212-221.
25. Wright, A. (1971) J. Bacteriol. 105, 927-936.
26. Troy, F.A., Freeman, F.E. y Heath, E.C. (1971) J. Biol. Chem. 246, 118-133.
27. Troy, F.A., Vijay, I.K. y Tesche, N. (1975) J. Biol. Chem. 250, 156-163.
28. Umbreit, J.N. y Strominger, J.L. (1972) J. Bacteriol. 112, 1306-1309.
29. Higashi, Y., Strominger, J.L. y Sweeley, C.C. (1970) J. Biol. Chem. 245, 3697-3702.
30. Behrens, N.H. y Leloir, L.F. (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 66, 153-159.
31. Barr, R.M. y Hemming, F.W. (1972) Biochem. J. 126, 1203-1208.
32. Evans, P.J. y Hemming, F.W. (1973) FEBS Lett. 31, 335-338.
33. Baynes, J.W., Hsu, A.F. y Heath, E.C. (1973) J. Biol. Chem. 248, 5693-5704.
34. Martin, H.G. y Thorne, K.J.I. (1974) Biochem. J. 138, 281-289.
35. Jung, P. y Tanner, W. (1973) Eur. J. Biochem. 37, 1-6.
36. Wildman, S.G. y Cohen, M. (1955) en Encyclopedia of Plant Physiology (Ed. Ruhland, W.) Vol, I, Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, p. 243-300.



37. Bonner, J. (1965) en *Plant Biochemistry* (Ed. Bonner, J. y Varner, J.E.) Academic Press, Nueva York y Londres, p. 665-692.
38. Rowland, R.L., Latimer, P.H. y Giles, J.A. (1956) *J. Am. Chem. Soc.* 78, 4680-4683.
39. Hemming, F.W., Morton, R.A. y Pennock, J.F. (1963) *Proc. Roy. Soc. London Ser. B.* 158, 291-310.
40. Feeney, J. y Hemming, F.W. (1967) *Anal. Biochem.* 20, 1-15.
41. Thorne, K.J.I. y Kodicek, E. (1962) *Biochim. Biophys. Acta* 59, 295-306.
42. Martin, H.G. y Thorne, K.J.I. (1974) *Biochem. J.* 138, 277-280.
43. Dankert, M. y Behrens, N.H. (1971) *Anales de la Sociedad Científica Argentina*, número especial en homenaje al Dr. Luis F. Leloir, Premio Nobel de Química, año 1970, p. 145-164.
44. Wellburn, A.R., Stevenson, J., Hemming, F.W. y Morton, R.A. (1967) *Biochem. J.* 102, 313-324.
45. Stone, K.J., Wellburn, A.R., Hemming, F.W. y Pennock, J.F. (1967) *Biochem. J.* 102, 325-330.
46. Dunphy, P.J., Kerr, J.D., Pennock, J.F., Whittle, K.J. y Feeney, J. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* 136, 136-147.
47. Wellburn, A.R. y Hemming, F.W. (1966) *Nature* 212, 1364-1366.
48. Lindgren, B.O. (1965) *Acta Chem. Scand.* 19, 1317-1326.
49. Thorne, K.J.I. y Kodicek, E. (1966) *Biochem. J.* 99, 123-127.
50. Gough, D.P., Kirby, A.L., Richards, J.B. y Hemming, F.W. (1970) *Biochem. J.* 113, 167-170.
51. Unbreit, J.K., Stone, K.J. y Strominger, J.L. (1972) *J. Bacteriol.* 112, 1302-1305.

52. Barr, R.M. y Hemming, F.W. (1972) *Biochem. J.* 126, 1193-1202.
53. Stone, K.J., Butterworths, P.H.W. y Hemming, F.W. (1967) *Biochem. J.* 102, 443-455.
54. Richards, J.B. y Hemming, F.W. (1972) *Biochem. J.* 128, 1345-1352.
55. Walton, M.J. y Pennock, J.F. (1972) *Biochem. J.* 127, 471-479.
56. Pennock, J.F., Hemming, F.W. y Morton, R.A. (1960) *Nature* 186, 470-472.
57. Burgos, J., Hemming, F.W., Pennock, J.F. y Horton, R.A. (1963) *Biochem. J.* 88, 470-482.
58. Dankert, M., Wright, A., Kelley, W.S. y Robbins, P.W. (1966) *Arch. Biochem. Biophys.* 116, 425-435.
59. Scher, M., Lennarz, W.J. y Sweeley, C.C. (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 59, 1313-1320.
60. Takayama, K. y Armstrong, L.L. (1971) *FEBS Lett.* 18, 67-69.
61. Nikaido, H., Nikaido, K., Nakae, T. y Mäkelä, P.H. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 3902-3911.
62. Nikaido, K. y Nikaido, H. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 3912-3919.
63. Jankowski, W., Mańkowski, T. y Chojnacki, T. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 337, 153-162.
64. Schultz, J. y Elbein, A.D. (1974) *Arch. Biochem. Biophys.* 160, 311-322.
65. Anderson, R.G., Hussey, H. y Baddiley, J. (1972) *Biochem. J.* 127, 11-25.
66. Hancock, I.C. y Baddiley, J. (1972) *Biochem. J.* 127, 27-37.

67. Johnson, J.G. y Wilson, D.B. (1975) *Biochem. Soc. Trans.* 3, 1095-1096.
68. García R.C., Recondo, E. y Dankert, M. (1974) *Eur. J. Biochem.* 43, 93-105.
69. Sutherland, I.W. y Norval, M. (1970) *Biochem. J.* 120, 567-576.
70. Lomax, J.A., Poxton, I.R. y Sutherland, I.W. (1973) *FEBS Lett.* 34, 232-234.
71. Douglas, L.J. y Baddiley, J. (1968) *FEBS Lett.* 1, 114-116.
72. Russey, H. y Baddiley, J. (1972) *Biochem. J.* 127, 39-50.
73. García, R.C., Recondo, E. y Dankert, M. Observaciones no publicadas.
74. Anderson, J.S., Matsubashi, M., Haskin, M.A. y Strominger, J.L. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 3180-3190.
75. Katz, W., Matsubashi, M., Dietrich, C.P. y Strominger, J.L. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 3207-3217.
76. Matsubashi, M., Dietrich, C.P. y Strominger, J.L. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 3191-3206.
77. Tanner, W. (1969) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 35, 144-150.
78. Sentandreu, R. y Lampen, J.O. (1971) *FEBS Lett.* 14, 109-113.
79. Tanner, W., Jung, P. y Behrens, N.H. (1971) *FEBS Lett.* 16, 245-248.
80. Bretthauer, R.K., Wu, S. y Irwin, W.E. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 304, 736-747.
81. Palamarczyk, G. y Chojnacki, T. (1973) *FEBS Lett.* 34, 201-203.
82. Lehle, L. y Schwarz, R.T. (1976) *Eur. J. Biochem.* 67, 239-245.

83. Lehle, L. y Tanner, W. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 399, 364-374.
84. Létoublon, R.C.P., Comte, J. y Got, R. (1973) *Eur. J. Biochem.* 40, 95-101.
85. Keenan, R.W., Matula, J.M. y Holloman, L. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 326, 84-92.
86. Keenan, R.W., Kruczek, M. y Fusinato, L. (1975), *Arch. Biochem. Biophys.* 167, 697-705.
87. Villemez, C.L. y Clark, A.F. (1969) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 36, 57-63.
88. Kauss, H. (1969) *FEBS Lett.* 5, 81-84.
89. Villemez, C.L. (1970) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 40, 636-641.
90. Alam, S.S. y Hemming, F.W. (1973) *Phytochem.* 12, 1641-1649.
91. Forsee, W.T., Valkovich, G. y Elbein, A.D. (1976) *Arch. Biochem. Biophys.* 174, 469-479.
92. Lehle, L., Fartaczek, F., Tanner, W. y Kauss, H. (1976) *Arch. Biochem. Biophys.* 175, 419-426.
93. Ericson, M.C. y Delmer, D.P. (1976) *Plant Physiol.* 57 (Suplem.) 45.
94. Forsee, W.T. y Elbein, A.D. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 2856-2867.
95. Hiuman, M.B. y Villemez, C.L. (1975) *Plant Physiol.* 56, 608-612.
96. Forsee, W.T. y Elbein, A.D. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 9283-9293.
97. Quesada Allué, L.A., Belocopitow, E. y Marechal, L.R. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 66, 1201-1208.
98. Quesada Allué, L.A., Marechal, L.R. y Belocopitow, E. (1976) *FEBS Lett.* 67, 243-247.



99. Caccam, J.F., Jackson, J.J. y Eylar, E.H. (1969) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 35, 505-511.
100. Waechter, C.J., Lucas, J.J. y Lennarz, W.J. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 7570-7579.
101. Waechter, C.J., Lucas, J.J. y Lennarz, W.J. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 56, 343-350.
102. Struck, D.K. y Lennarz, W.J. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 2511-2519.
103. Kean, E.L. (1976) *Federation Proc.* 35, 1539.
104. Arnold, D., Hommel, E. y Risse, H.J. (1976) *Mol. Cell. Biochem.* 11, 137-147.
105. Breckenridge, W.C. y Wolfe, L.S. (1973) *FEBS Lett.* 29, 66-68.
106. Lucas, J.J., Waechter, C.J. y Lennarz, W.J. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 1992-2002.
107. Levy, J.A., Carminatti, H., Cantarella, A.I., Behrens, N.H., Leloir, L.F. y Tábora, E. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 60, 118-125.
108. Behrens, N.H., Parodi, A.J., Leloir, L.F. y Krisman, C.R. (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* 143, 375-383.
109. Richards, J.B. y Hemming, F.W. (1972) *Biochem. J.* 130, 77-93.
110. Barr, R.M. y De Luca, L.M. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 60, 355-363.
111. Zatz, M. y Barondes, S.H. (1969) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 36, 511-517.

112. Waechter, C.J., Kennedy, J.L. y Harford, J.B. (1976) Arch. Biochem. Biophys. 174, 726-737.
113. Chambers, J. y Elbein, A.D. (1975) J. Biol. Chem. 250, 6904-6915.
114. Forsee, W.T. y Elbein, A.D. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 2574-2578.
115. Tkacz, J.S., Herscovics, A., Warren, C.D. y Jeanloz, R.W. (1974) J. Biol. Chem. 249, 6372-6381.
116. Herscovics, A., Warren, C.D. y Jeanloz, R.W. (1975) J. Biol. Chem. 250, 8079-8084.
117. Wedgwood, J.F., Strominger, J.L. y Warren, C.D. (1974) J. Biol. Chem. 249, 6316-6324.
118. Herscovics, A., Warren, C.D., Jeanloz, R.W., Wedgwood, J.F., Liu, I.Y. y Strominger, J.L. (1974) FEBS Lett. 45, 312-317.
119. White, D.A. y Waechter, C.J. (1975) Biochem. J. 146, 645-651.
120. Patt, L.M. y Grimes, W.J. (1974) J. Biol. Chem. 249, 4157-4165.
121. De Luca, L., Rosso, G. y Wolf, G. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 615-620.
122. De Luca, L., Maestri, N., Rosso, G. y Wolf, G. (1973) J. Biol. Chem. 248, 641-648.
123. Rosso, G.C., De Luca, L., Warren, C.D. y Wolf, G. (1975) J. Lipid Res. 16, 235-243.
124. Jankowski, W. y Chojnacki, T. (1972) Biochim. Biophys. Acta 260, 93-97.
125. Zatta, P., Zakim, D. y Vessey, D.A. (1975) Biochim. Biophys. Acta 392, 361-365.

126. Helting, T. y Peterson, P.A. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 46, 429-436.
127. Peterson, P.A., Rask, L., Helting, T., Ostberg, L. y Fernstedt, Y. (1976) J. Biol. Chem. 251, 4986-4995.
128. Molnar, J., Chao, H. e Ikehara, Y. (1971) Biochim. Biophys. Acta 239, 401-410.
129. Leloir, L.F., Staneloni, R.J., Carminatti, H. y Behrens, N.H. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 52, 1285-1292.
130. Palamarczyk, G. y Hemming, F.W. (1975) Biochem. J. 148, 245-251.
131. Zatta, P., Zakim, D. y Vessey, D.A. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 70, 1014-1019.
132. Heifetz, A., Forsee, W.T., Ligler, F. y Elbein, A.D. (1976) Fed. Proc. 35, 1539.
133. Ghalambor, M.A., Warren, C.D. y Jeanloz, R.W. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 56, 407-414.
134. Johnson, B.C. y Valkovich, G (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 48, 1437-1443.
135. Palamarczyk, G., Harrison, J. y Hemming, F.W. (1975) Biochem. Soc. Trans. 3, 665-666.
136. Herscovics, A., Warren, C.D. y Jeanloz, R.W. (1976) Fed. Proc. 35, 1540.
137. Behrens, N.H., Parodi, A.J. y Leloir, L.F. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 68, 2857-2860.

138. Behrens, N.H., Carminatti, H., Staneloni, R.J., Leloir, L.F. y Cantarella, A.I. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 3390-3394.
139. Parodi, A.J., Staneloni, R., Cantarella, A.I., Leloir, L.F., Behrens, N.H., Carminatti, H. y Levy, J.A. (1973) *Carbohydr. Res.* 26, 393-400.
140. Oliver, G.J.A., Harrison, J. y Hemming, F.W. (1975) *Eur. J. Biochem.* 58, 223-229.
141. Oliver, G.J.A. y Hemming, F.W. (1975) *Biochem. J.* 152, 191-199.
142. Adamany, A.M. (1976) *Fed. Proc.* 35, 1539.
143. Hsu, A.F., Baynes, J.W. y Heath, E.C. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71, 2391-2395.
144. Wedgwood, J.F., Warren, C.D., Jeanloz, R.W. y Strominger, J.L. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71, 5022-5025.
145. Lüderitz, O. (1970) *Angew. Chem. (Intern. Edit.)* 9, 649-663.
146. Lüderitz, O., Westphal, O., Staub, A.M. y Nikaido, H. (1971) en *Microbial Toxins* (Ed. Weinbaum, G., Kadis, S. y Ajl, S.J.) Vol. IV, Academic Press, Nueva York y Londres, p. 145-233.
147. Stocker, B.A.D. y Mäkelä, P.H. (1971) en *Microbial Toxins* (Ed. Weinbaum, G., Kadis, S. y Ajl, S.J.) Vol. IV, Academic Press, Nueva York y Londres, p. 369-438.
148. Osborn, M.J., Gander, J.E. y Parisi, E. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 3973-3986.
149. Osborn, M.J. y Rothfield, L.I. (1971) en *Microbial Toxins* (Ed. Weinbaum, G., Kadis, S. y Ajl, S.J.) Vol. IV, Academic Press, Nueva York y Londres, p. 331-350.



150. Rothfield, L. y Pearlman, M. (1966) J. Biol. Chem. 241, 1386-1392.
151. Rothfield, L. y Romeo, D. (1971) Bacteriol. Rev. 35, 14-38.
152. Uchida, T., Robbins, P.W. y Luria, S.E. (1963) Biochemistry 2, 663-668.
153. Robbins, P.W., Wright, A. y Bellows, J.L. (1964) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 52, 1302-1309.
154. Robbins, P.W. y Uchida, T. (1965) J. Biol. Chem. 240, 375-383.
155. Robbins, P.W. y Wright, A. (1971) en Microbial Toxins (Ed. Weinbaum, G., Radis, S. y Ajl, S.J.) Vol. IV, Academic Press, Nueva York y Londres, p. 351-368.
156. Robbins, P.W., Bray, D., Dankert, M. y Wright, A. (1967) Science 158, 1536-1542.
157. Goldman, R. y Strominger, J.L. (1972) J. Biol. Chem. 247, 5116-5122.
158. Siewert, G. y Strominger, J.L. (1967) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 57, 767-773.
159. Stone, K.J. y Strominger, J.L. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 68, 3223-3227.
160. Willoughby, E., Higashi, Y. y Strominger, J.L. (1972) J. Biol. Chem. 247, 5113-5115.
161. Higashi, Y., Siewert, G. y Strominger, J.L. (1970) J. Biol. Chem. 245, 3683-3690.

162. Osborn, M.J. y Weiner, I.M. (1968) J. Biol. Chem. 243, 2631-2639.
163. Sasaki, T., Uchida, T. y Kurahashi, K. (1974) J. Biol. Chem. 249, 761-772.
164. Armstrong, J.J., Baddiley, J., Buchanan, J.G. y Carss, B. (1958) Nature 181, 1692-1693.
165. Mauck, J. y Glaser, L. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69, 2386-2390.
166. Fiedler, F. y Glaser, L. (1974) J. Biol. Chem. 249, 2684-2689.
167. Toon, P., Brown, P.E. y Baddiley, J. (1972) Biochem. J. 127, 399-409.
168. Schmit, A.S., Pless, D.D. y Lennarz, W.J. (1974) Ann. N.Y. Acad. Sci. 235, 91-104.
169. Adamany, A.M. y Spiro, R.G. (1975) J. Biol. Chem. 250, 2842-2854.
170. Babczinski, P. y Tanner, W. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 54, 1119-1124.
171. Bretthauer, R.K. y Wu, S. (1975) Arch. Biochem. Biophys. 167, 151-160.
172. Cabib, E. (1963) Ann. Rev. Biochem. 32, 321-354.
173. Mascarenhas, J.P. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 142-149.
174. Glaser, L. (1958) J. Biol. Chem. 232, 627-636.
175. Colvin, J.R. (1959) Nature 183, 1135-1136.

176. Khan, A.W. y Colvin, J.R. (1961) *Science* 133, 2014-2015.
177. Hestrin, S. y Schramm, M. (1954) *Biochem. J.* 58, 345-352.
178. Mordoh, J., Hirota, Y. y Jacob, F. (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 67, 773-778.
179. Costerton, J.W., Forsberg, C., Matula, T.I., Buckmire, F.L.A. y MacLeod, R.A. (1967) *J. Bacteriol.* 94, 1764-1777.
180. Davison, E.A. (1966) en *Methods in Enzymology* (Ed. Neufeld, E.F. y Ginsburg, V.) Vol. VIII, Academic Press, Nueva York y Londres, p. 52-60.
181. Dawson, R.M.C. (1954) *Biochim. Biophys. Acta* 14, 374-379.
182. Bernfeld, P. (1955) en *Methods in Enzymology* (Ed. Colowick, S.P. y Kaplan, N.O.) Vol. I, Academic Press, Nueva York y Londres, p. 149-158.
183. Spiro, R.G. (1966) en *Methods in Enzymology* (Ed. Neufeld, E.F. y Ginsburg, V.) Vol. VIII, Academic Press, Nueva York y Londres, p. 26-52.
184. Belocopitow, E. y Marechal, L.R. (1973) *Anal. Biochem.* 53, 108-114.
185. Rouser, G., Kritchevsky, G., Heller, D. y Lieber, E. (1963) *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 40, 425-454.
186. Tábora, E. (1976) Tesis. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, p. 31, 74-81.
187. Pelc, E (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 208, 155-156.
188. Stahl, E. (1964) en *Thin Layer Chromatography* (Ed. Stahl, E.) Academic Press, Nueva York p. 190.

189. Folch, J. , Lees, M. y Sloane Stanley, G.H. (1957) J. Biol. Chem. 226, 497-509.
190. Dunphy, P.J., Whittle, K.J. y Pennock, J.F. (1965) Chem. and Ind. 27, 1217-1221.
191. Paladini, A.C. y Leloir, L.F. (1952) Biochem. J. 51, 426-430.
192. Tung, K.K. y Nordin, J.H. (1968) Biochim. Biophys. Acta 158, 154-156.
193. Jeanes, A., Wise, C.S. y Dimler, R.J. (1951) Anal. Chem. 23, 415-420.
194. Carminatti, H., Passeron, S., Dankert, M. y Recondo, E. (1965) J. Chromatog. 18, 342-348.
195. Matthias, W. (1954) Naturwiss. 41, 17.
196. Anderson, J.S., Meadow, P.M., Hasking, M.A. y Strominger, J.L. (1966) Arch. Biochem. Biophys. 116, 487-515.
197. Trevelyan, W.E., Procter, D.P. y Harrison, J.S. (1950) Nature 166, 444-445.
198. Burrows, S., Grylls, F.S.M. y Harrison, J.S. (1952) Nature 170, 800-801.
199. Smith, F. y Montgomery, R. (1956) en Methods of Biochemical Analysis (Ed. Glick, D.) Vol. III, Interscience Publishers, Nueva York y Londres, p. 153-212.
200. Dische, Z. y Shettles, L.B. (1948) J. Biol. Chem. 175, 595-603.
201. Spiro, R.G. (1966) en Methods in Enzymology (Ed. Neufeld, E.F. y Ginsburg, V.) Vol. VIII, Academic Press, Nueva York y Londres, p. 3-26.



202. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275.
203. Chen, P.S., Jr., Toribara, T.Y. y Warner, H. (1956) Anal. Chem. 28, 1756-1758.
204. Hess, H.H. y Derr, J.E. (1975) Anal. Biochem. 63, 607-613.
205. Montgomery, E.M., Richtmyer, N.K. y Hudson, C.S. (1943) J. Am. Chem. Soc. 65, 3-7.
206. Whistler, R.L. y BeMiller, J.N. (1963) en Methods in Carbohydrate Chemistry (Ed. Whistler, R.L. y Wolfrom, M.L.) Vol. II, Academic Press, Nueva York y Londres, p. 35-37.
207. Cramer, F. y Böhm, W. (1959) Angew. Chem. 71, 775.
208. Popják, G., Cornforth, J.W., Cornforth, R.H., Ryhage, R. y Goodman, D.S. (1962) J. Biol. Chem. 237, 56-61.
209. Osborn, M.J., Cynkin, M.A., Gilbert, J.M., Müller, L. y Singh, M. (1972) en Methods in Enzymology (Ed. Ginsburg, V.) Vol. XXVIII, Academic Press, Nueva York y Londres, p. 583-601.
210. Conrad, R.E. (1972) en Methods in Carbohydrate Chemistry (Ed. Whistler, R.L. y BeMiller, J.N.) Vol. VI, Academic Press, Nueva York y Londres, p. 154-157.
211. Algranati, I.D., Behrens, N.H., Carminatti, H. y Cabib, E. (1966) en Methods in Enzymology (Ed. Neufeld, E.F. y Ginsburg, V.) Vol. VIII, Academic Press, Nueva York y Londres, p. 411-416.
212. Thomas, J.A., Schlender, K.K. y Larner, J. (1968) Anal. Biochem. 25, 486-499.
213. Bray, G.A. (1960) Anal. Biochem. 1, 279-285.
214. Gennis, R.B. y Strominger, J.L. (1976). J. Biol. Chem. 251, 1264-1269.